

Université de Montréal

Mise au point d'un modèle de leucémie chez la Drosophile

Par

Amélie Casgrain

Biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences en Biologie moléculaire

Novembre 2005

© Amélie Casgrain, 2005



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des Études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Mise au point d'un modèle de leucémie chez la Drosophile

présenté par :

Amélie Casgrain

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Trang Hoang, Président-rapporteur

Guy Sauvageau, Directeur de recherche

Marc Therrien, Codirecteur

Marco Di Fruscio, Membre du jury

RÉSUMÉ

Le projet a été établi dans l'optique de mettre au point un modèle de leucémie dans le système hématopoïétique de la drosophile (*Drosophila melanogaster*) qui pourra être utilisé pour l'identification par approche génétique d'évènements moléculaires conduisant au développement de la leucémie. Le système d'expression UAS/GAL4 a été utilisé pour exprimer les translocations *E2A-PBX1 α* et *NUP98-HOXA9*, impliquées respectivement dans les leucémies lymphoïdes et myéloïdes humaines. Des promoteurs spécifiques ont permis l'étude de leur expression dans le système hématopoïétique (i.e. Cg-GAL4) et dans le développement de l'oeil. L'expression de *NUP98-HOXA9* par Cg-GAL4 induit la formation de masses ressemblant à des tumeurs dans les larves, ce qui semble moins fréquent lors de l'expression de *E2A-PBX1 α* . Le phénotype de *NUP98-HOXA9* semble être exacerbé en présence de *E2A-PBX1 α* , ce qui correspond au rôle accélérateur de *E2A-PBX1 α* décrit dans les leucémies des mammifères. *NUP98-HOXA9* induit aussi un défaut au niveau du développement de l'oeil. Dans le futur, le phénotype décrit pourra servir pour l'établissement un crible, soit au niveau du développement de l'oeil ou au niveau du système hématopoïétique, afin d'identifier des molécules impliquées dans le développement de ce modèle leucémique. Ensuite, le rôle des molécules ainsi identifiées pourra être analysé au niveau du développement des leucémies chez les mammifères.

MOTS CLÉS

Drosophile, système hématopoïétique, masse mélanotique, translocation, *NUP98-HOXA9*, *E2A-PBX1 α* , leucémie.

ABSTRACT

The aim of the project was to establish a model of leukemia using the *Drosophila melanogaster* haematopoietic system, which would serve in the identification of molecular events involved in leukemia development. The UAS/GAL4 expression system was used to study the effects of two translocations found in human leukemia: *E2A-PBX1a* which induces lymphoid leukemia and *NUP98-HOXA9* which induces myeloid leukemia. Using specific promoters, I analysed the expression of these oncogenes in the haematopoietic system and during the eye development. The expression of *NUP98-HOXA9* with the haematopoietic specific promoter Cg-GAL4 leads to the formation of tumour-like masses while the phenotype induced by the expression of *E2A-PBX1a* is less severe. When expressed together the two translocations lead to a stronger phenotype than that observed with *NUP98-HOXA9* only. This is consistent with the acceleration role described for *E2A-PBX1a* in mammal leukemias. *Nup98-HOXA9* also induces a developmental defect in the eye. The phenotype described could be used in a screen either in the eye development or in the haematopoietic system in order to find new molecules implicated in the development of this leukemia model. The relevance of putative new players in the development of leukemia identified in such a screen could be further analyzed in mammalian systems.

KEY WORDS

Drosophila, haematopoietic system, melanotic masses, translocation, *Nup98-HOXA9*, *E2A-PBX1a*, leukemia.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xiii
 CHAPITRE I: Introduction	 1
1. LA LEUCÉMIE	2
1.1. Principes généraux	2
1.2. Les gènes <i>Hox</i>	3
2. LA DROSOPHILE	12
2.1. La drosophile comme modèle d'étude	12
2.2. Le système hématopoïétique de la drosophile	13
2.3. Outils pour l'étude du système hématopoïétique	26
3. PRÉSENTATION DU PROJET	36
 CHAPITRE II : Matériels & Méthodes	 38
1. LIGNÉES DE MOUCHES	39
1.1. Culture des mouches	39
1.2. Lignées utilisées	39
2. CONSTRUCTION DES LIGNÉES TRANSGÉNIQUES	39
2.1. Construction des plasmides et séquençage	39
2.2. Microinjection	42
2.3. Lignées portant deux intégrations	42
3. ANALYSE CELLULAIRE	43
3.1. Compte cellulaire	43
4. ANALYSE DES LARVES	43
4.1. Choc thermique	43
4.2. Histochimie	44
5. ANALYSE DES MASSES MÉLANOTIQUES	44
5.1. Décompte des masses mélanotiques	44
5.2. Dissection des masses	44
6. EXPRESSION DES ONCOGÈNES DANS LES YEUX	44
6.1. Croisement	44
6.2. Préparation des échantillons et SEM	45

CHAPITRE III : Résultats	46
1. LIGNÉES TRANSGÉNIQUES	47
2. EXPRESSION DE TRANSLOCATIONS LEUCÉMOGÉNIQUES DANS LE SYSTÈME HÉMATOPOÏÉTIQUE DE LA DROSOPHILE.....	49
2.1 Phénotype cellulaire	49
2.2 Formation des masses mélanotiques.....	54
2.3 Analyse du phénotype de masse mélanotique vs celui de surprolifération	57
3. EFFETS DES COLLABORATEURS CONNUS DE HOXA9	58
3.1. Phénotypes seuls.....	62
3.2. Coopération de NUP98-HOXA9 et ses collaborateurs.....	63
4. DÉVELOPPEMENT DE L'ŒIL.....	63
CHAPITRE IV : Discussion	67
1. LES TRANSLOCATIONS	68
2. MODÈLE DE LEUCÉMIE	69
2.1. Analyse du phénotype : Développement de masses mélanotiques.....	69
2.2 Comparaison du comportement des translocations chez la drosophile vs chez les mammifères.....	71
2.3 Confirmation du phénotype leucémique	72
3. COLLABORATION.....	73
3.1. Effet des collaborateurs connus de HOXA9	73
4. PHÉNOTYPE DANS L'ŒIL.....	74
5. CONCLUSION	75
RÉFÉRENCES	77
ANNEXES	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Promoteurs du système hématopoïétique pouvant être utilisé avec le système d'expression UAS/GAL4	27
Tableau 2.1 Énumération des différentes lignées utilisées	41
Tableau 3.1 Données phénotypiques des intégrations de <i>UAS-NUP98-HOXA9</i> et <i>UAS-E2A-PBX1α</i>	48

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Expression des <i>HOX/HOM-C</i> dans le développement.....	4
Figure 1.2. Représentation schématique des translocations <i>NUP98-HOXA9</i> et <i>E2A-PBX1a</i> impliquées dans les leucémies	10
Figure 1.3 Système hématopoïétique de la drosophile	16
Figure 1.4 Marqueurs spécifiques aux hémocytes	21
Figure 1.5 Formation de masses mélanotiques chez la larve	25
Figure 1.6 Visualisation des cellules du système hématopoïétique.....	30
Figure 1.7 Compte cellulaire.....	32
Figure 1.8 Histochimie sur les larves.....	34
Figure 3.1 Surprolifération cellulaire induite par <i>RAS^{v12}</i>	50
Figure 3.2 Choc thermique en présence de <i>Cg-GAL4</i> et <i>Ras^{v12}</i> , <i>Abd-B</i> , <i>hth</i> ou <i>E2A-PBX1a</i>	51
Figure 3.3 Choc thermique en présence de <i>Hml-GAL4</i> et des différentes intégrations de <i>NUP98-HOXA9</i>	53
Figure 3.4 Choc thermique en présence de <i>Cg-GAL4</i> et des différentes intégrations de <i>NUP98-HOXA9</i>	55
Figure 3.5 Décompte des masses mélanotiques	56
Figure 3.6 Histochimie sur les L3	60
Figure 3.7 Dissection d'une masse mélanotique d'une larve <i>Cg-GAL4</i> , <i>UAS-eGFP</i> ; <i>UAS-Nup98-HoxA9</i>	61
Figure 3.8 Collaboration entre deux oncogènes : Co-expression de <i>E2A-</i> <i>PBX1a</i> et <i>NUP98-HOXA9</i> sous le contrôle de <i>Cg-GAL4</i>	64
Figure 3.9 Désorganisation du développement de l'œil suite à l'expression de <i>NUP98-HOXA9</i> ou <i>E2A-PBX1a</i> sous le contrôle de <i>gmr-GAL4</i>	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

abd-A	abdominal-A
Abd-B	Abdominal-B
ABL	Abelson
AD	Activation Domain
ADNc	ADN complémentaire
AML-1	Acute myelogenous leukemia-1
Antp	Antennapedia
AuPd	Or-Palladium
BCR	Breakpoint Cluster Region
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
brm	brahma
BSA	Bovin Serum Albumin
Cg	Collagen
CNK	Connector enhancer of KSR
col	collier
CSP	Centre de Signalisation Postérieur
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
Dfd	Deformed
Dif	Dorsal-related immunity factor
dl	dorsal
Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
exd	extradenticle
ey	eyeless
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting

FOG	Friend of GATA
ftz	fushi tarazu
gcm	glial cell missing
GFP	Green fluorescent protein
gmr	glass multiple repeat
H&E	Haematoxylin and Eosin
He	Hemese
Hml	Hemolymph
HOM-C	Homeotic-gene complex
hop	hopscotch
hop ^{tum-l}	hopscotch ^{tumorous-lethal}
Hox	Homeotic box
hsp70	heat shock protein 70
hth	homothorax
imd	immune deficiency
Jak	Janus kinase
KSR	Kinase Suppressor of Ras
l(1)mbn	lethal (1) malignant blood neoplasm
L1, 2, 3	stade 1,2 ou 3 du développement larvaire
Lab	Labial
LLA	Leucémie lymphoïde aigue
LMA	Leucémie myéloïde aigue
lwr	lesswright
Lz	Lozenge
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice extra-cellulaire
MEIS	Myeloid Ecotropic Insertion Site

MLL	Mixed Lineage Leukemia
mx _c	multi sex combs
N	Notch
NF κ B	Nuclear Factor kappa B
NUP98	Nucloporin 98
odd	odd skipped
Pb	Proboscipedia
PBS	Phosphate-buffered Saline
PBX	Pre-B cell leukemia transcription fractor
PcG	Polycomp Group
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldéhyde
ProPo	Prophenoloxydase
PVR	Poliovirus Receptor
Pxn	Peroxydasine
Raf	Rapidly growing fibrosarcomas
Ras	Rat sarcoma
Rel	Relish
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RUNX-1	Runt related transcription factor-1
Scr	Sex combs reduced
sE	sevenless enhancer
SEM	Scanning Electron Microscopy
Ser	Serrate
sev	sevenless
srp	serpent

Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
TALE	Three Amino acid Loop Extension
Tl	Toll
TrxG	Trithorax Group
UAS	Upstream Activating Sequence
Ubx	Ultrabithorax
upd-3	unpaired-3
ush	u-shapped
VEGF	Vascular/Endothelial cell Growth Factor
vkg	viking
wg	wingless
ytr	yantar

À mon père.

CHAPITRE I: Introduction

1. LA LEUCÉMIE

1.1. Principes généraux

Selon la Société Canadienne du Cancer, le Canada compte environ 4000 nouveaux cas de leucémies pour l'année 2005. De plus, la leucémie est le cancer le plus répandu chez les enfants. Son pronostic est très défavorable avec un ratio décès/nouveau cas de 56%. Ces chiffres démontrent l'importance de poursuivre la recherche sur la leucémie. Mais qu'est-ce que la leucémie?

On décrit la leucémie comme une maladie néoplasique des tissus hématopoïétiques qui affectent la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules sanguines matures. Les leucémies sont classifiées selon la morphologie des cellules, la constitution antigénique, les marqueurs enzymatiques et les anomalies chromosomiques qui les distinguent (Lee et al., 1993). On peut distinguer quatre types de leucémies. D'abord, l'origine du précurseur permet une première classification : on les divise en leucémies lymphoïdes (précurseur lymphoïde) ou myéloïdes (précurseur myéloïde). Aussi, les leucémies sont classées selon la rapidité avec laquelle les symptômes et les complications apparaissent. Une leucémie biologiquement homogène et stable, avec un pouvoir de prolifération lent est dite chronique. La phase chronique peut se développer, suite à des événements mutationnels secondaires, en phase aigue, c'est-à-dire plus hétérogène, beaucoup plus agressive et capable de proliférer rapidement (Israels et Israels, 1997).

Le développement de la leucémie est un processus à plusieurs étapes qui implique souvent des réarrangements chromosomiques, telles les translocations, mais aussi des événements mutationnels

secondaires (revu par Lin et Aplan, 2004). Ces changements s'accumulent dans le génome de la cellule souche leucémique qui acquière ainsi un plus grand pouvoir de prolifération. Cette cellule souche conduit alors au développement de la leucémie. Les translocations retrouvées dans les leucémies induisent l'expression et/ou l'activation aberrante de gènes, souvent des tyrosines kinases, tel ABL (Abelson) ou des facteurs de transcription tel HOXA9.

1.2. Les gènes *Hox*

La famille des gènes *Hox* (Homeotic box) a largement été conservée durant l'évolution. Leur arrangement chez les mammifères résultent probablement d'une quadruplication d'un seul complexe ancestral puisqu'on les retrouve dispersé en 4 groupes, A, B, C, D dans le génome. Chacun des groupes est divisés en 13 paralogues, pour un total de 39 gènes *Hox*. Chez la drosophile, on retrouve 8 homologues, regroupés dans le complexe *HOM-C* (Homeotic-gene complex) (Schughart et al., 1989) (Figure 1.1).

Les *Hox* codent pour des protéines possédant un homéodomaine, i.e. une séquence de 61 acides aminés leur permettant de lier l'ADN et d'agir comme facteur de transcription (Scott et al., 1989) et peuvent former des complexes avec des protéines à homéodomaine du groupe TALE (Three Amino-acid Loop Extension), dont PBX1 (Pre-B cell leukemia transcription factor 1) et MEIS1 (Myeloid Ecotropic Insertion Site 1). Le complexe qui en résulte leur permet de lier l'ADN de façon hautement spécifique (Shen et al., 1997a; Shen et al., 1999).

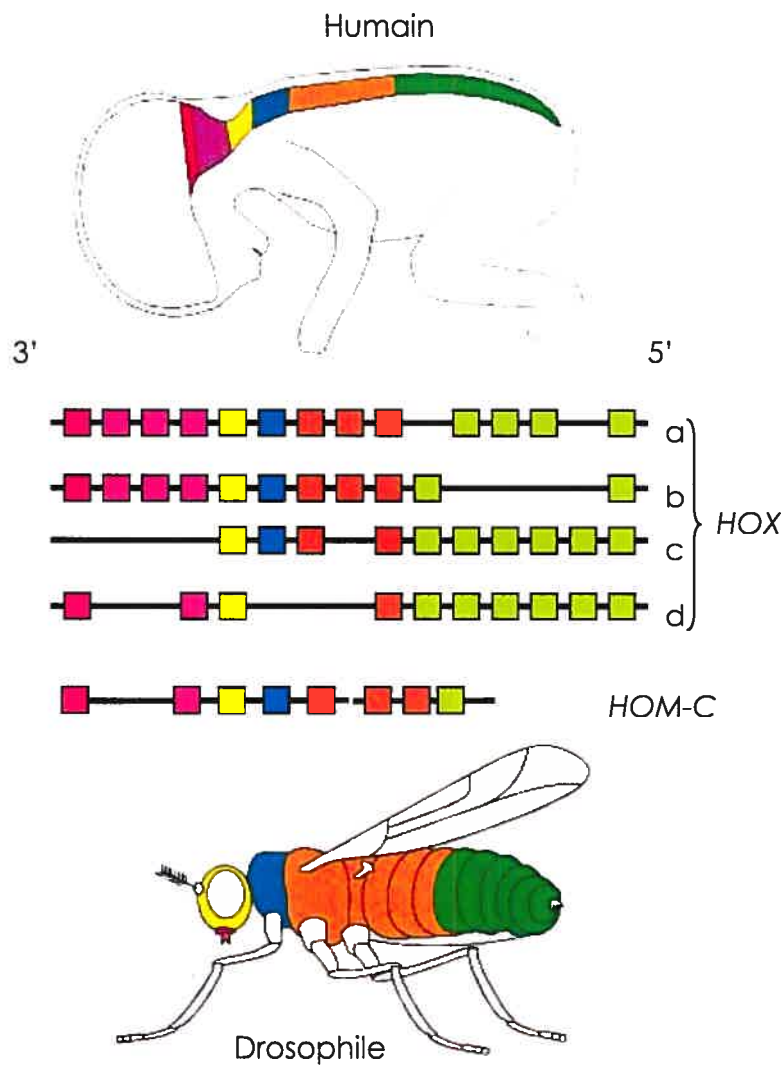


Figure 1.1 Expression des *HOX/HOM-C* dans le développement; modifiée de Grier et al., 2005. Les gènes *Hox* ont été conservés durant l'évolution. On les retrouve regroupés dans le complexe *HOM-C* chez la drosophile, et en quatre groupes *HOX* chez les humains. Ces quatre groupes proviennent d'un seul et même groupe ayant subi une quadruplication durant l'évolution. Leur expression dans le développement se fait de façon colinéaire, i.e. l'arrangement qu'ils ont dans le génome correspond à l'axe antéro-postérieur d'expression.

Les paralogues 1 à 10 interagissent avec PBX1 alors que les paralogues 9 à 13 interagissent avec MEIS1 (Shen *et al.*, 1997a; Shen *et al.*, 1997b). Aussi, PBX1 et MEIS1 interagissent ensemble et ceci permet la localisation nucléaire de PBX1 (Chang *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 2000). HOX, PBX1 et MEIS1 sont co-transcrits lors du développement (Owens et Hawley, 2002).

1.2.1 Protéines à homéodomaine chez la drosophile

Les gènes *Hox* ont d'abord été étudiés chez la drosophile pour leur rôle dans le développement du patron antéro-postérieur, rôle conservé chez les autres métazoaires. Comme mentionné précédemment, les gènes *Hox* chez la drosophile sont regroupés sous le complexe HOM-C comprenant 10 gènes : *lab* (*labial*), *pb* (*proboscipedia*), *Hox3/zen*, *Dfd* (*Deformed*), *Scr* (*Sex combs reduced*), *ftz* (*fushi tarazu*), *Antp* (*Antennapedia*), *Ubx* (*Ultrabithorax*), *abd* (*abdominal*)-A et *Abd-B*. Les protéines HOX3/ZEN et FTZ ayant perdu leur fonction homéotique, on considère que la drosophile n'a que huit gènes homéotiques (Akam *et al.*, 1994; Gibson, 2000). On les divise en deux complexes : Antennapedia (*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* et *Antp*) et Bithorax (*Ubx*, *abd-A* et *Abd-B*) (Lewis, 1978). Leur expression lors du développement confère une identité unique à chaque segment (Figure 1.1) et est requise de l'embryogénèse jusqu'aux dernières étapes du développement adulte (Castelli-Gair *et al.*, 1994). La spécificité d'action des différents HOX dans les tissus vient de la compétition entre les protéines HOX dans la cellule (Heuer et Kaufman, 1992). Par exemple, UBX et ABD-A entre en compétition pour la formation d'un complexe

avec ABD-B, ce qui permettra la formation des spiracles (Castelli-Gair et al., 1994).

Les produits des gènes *Hox* de la drosophile s'associent avec les protéines à homéodomaine EXD (Extradenticle), homologue de PBX1, et HTH (Homothorax), homologue de MEIS1. Comme pour les homologues mammifères, le dimère EXD-HTH est nécessaire au transport nucléaire de EXD (Rieckhof et al., 1997; Pai et al., 1998; Abu-Shaar et al., 1999; Berthelsen et al., 1999). L'hétérocomplexe HTH/EXD/HOX lie l'ADN et permet l'activation ou la répression spécifique de gènes (Gebelein et al., 2004).

1.2.2 Rôle dans le développement

L'organisation génomique des gènes *Hox* correspond à leur patron d'expression, une des caractéristiques phylogénétiquement conservées. En effet, leur organisation génomique représente l'ordre temporel et spatial selon lesquels ils seront actifs lors du développement embryonnaire tant chez la drosophile (Lewis, 1978) que chez les mammifères (Graham et al., 1989; Duboule et Dolle, 1989; Gaunt et al., 1990). Cette expression colinéaire permet de façonner le patron antérieur/postérieur lors du développement de l'organisme (Figure 1.1).

1.2.3 Rôle dans le système hématopoïétique

L'expression des gènes *Hox* est aussi observée dans les cellules du système hématopoïétique où le patron d'expression semble avoir un certain degré de colinéarité, bien que la caractérisation de cette expression ne soit pas complétée (Magli et al., 1991). Par exemple, on sait que *HOXA* et *B* sont préférentiellement exprimés dans les cellules

primitives hématopoïétiques et l'expression des gènes situés en 3' est favorisée (Sauvageau et al., 1994).

On a aussi démontré que différents *Hox* ont leur importance dans le développement du système hématopoïétique et que chacun possède un rôle très spécifique. Par exemple, la surexpression de *Hoxb4* dans les cellules de moelle osseuse de souris entraîne la prolifération des cellules primitives in vitro, sans toutefois affecter la quantité ni la qualité des cellules du sang lorsque transplantées (Sauvageau et al., 1995). Par contre, le même genre d'expérience avec *Hoxa10* induit des troubles myéloprolifératifs suite aux transplantations (Thorsteinsdottir et al., 1997). Des souris portant des délétions géniques pour les deux copies de *Hoxa9* ont permis de démontrer l'importance de celui-ci dans la différenciation des cellules granulocytaires et lymphocytaires (Lawrence et al., 1997).

En ce qui concerne la drosophile, aucune étude n'indique un rôle direct des *Hox* dans le développement du système hématopoïétique. Par contre, plusieurs faits portent à croire qu'ils y seraient impliqués. On sait que les gènes *PcG* (Polycomb Group) et les gènes *TrxG* (Trithorax Group) régulent l'expression des gènes *Hox* et qu'ils sont impliqués dans l'hématopoïèse des mammifères (revu par Gebuhr et al., 2000) de même que dans le développement de la drosophile (Beuchle et al., 2001). On a démontré que *mxc* (*multi sex combs*), membre du groupe *PcG*, et *brm* (*brahma*), membre du *TrxG*, contrôlent l'hématopoïèse chez la drosophile de façon directe (Remillieux-Leschelle et al., 2002). De plus, le mutant *l(1)mbn* (lethal (1) malignant blood neoplasm), connu pour causer des défauts dans le système hématopoïétique (Gateff, 1978) est en fait un allèle mutant de *mxc* (Santamaria et Randsholt, 1995; Saget et al., 1998). Finalement, Domino, qui est une ATPase ADN-

dépendent de la famille SWI/SNF (Ruhf et al., 2001), interagit avec les membres *PcG* et *Trx* pour réguler l'expression des *Hox*. Des mutations dans *domino* induisent la mélanisation des « lymph glands » (désormais traduit par « glandes lymphoïdes » dans le texte), et l'absence d'hémocytes en circulation (Braun et al., 1997). Toutes ces données laissent présager un rôle pour les gènes *Hox* de la drosophile dans le système hématopoïétique de la drosophile, tout comme chez les mammifères.

1.2.4 Implications des HOX dans les leucémies.

Les gènes *HOX* ont aussi été décrits pour avoir un rôle important dans les leucémies (revu par Grier et al., 2005). Par exemple, la surexpression par un vecteur retroviral de *Hoxb6* (Fischbach et al., 2005), *Hoxb8* (Perkins et Cory, 1993), *Hoxb3* (Thorsteinsdottir et al., 2001), *Hoxa10* (Thorsteinsdottir et al., 1997) ou *Hoxa9* (Kroon et al., 2001) dans les cellules de moelle osseuse de souris induit le développement de la leucémie.

Souvent, les *HOX* ont une implication indirect dans le développement des néoplasies. Par exemple, dans les leucémies induites par des translocations impliquant *MLL* (Mixed Lineage Leukemia), on observe fréquemment une expression inadéquate de *Hoxa9* et *Hoxa7* (Armstrong et al., 2002; Ayton et Cleary, 2003). Cependant, la translocation *NUP98-HOXA9* retrouvée dans les LMA (leucémies myéloïdes aigues) est un bon exemple d'une implication directe des *HOX* dans les leucémies (Nakamura et al., 1996; Borrow et al., 1996).

Cette translocation *NUP98-HOXA9* t(7;11)(p15;p15) se retrouve de façon rare mais récurrente dans les LMA. Elle implique la fusion de la partie N-terminale de la nucléoporine NUP98 (Nucleoporin 98) avec la portion C-terminal de la protéine HOXA9 (Nakamura *et al.*, 1996; Borrow *et al.*, 1996) (Figure 1.2a). Brièvement, NUP98 est une composante du complexe du pore nucléaire. Elle possède une répétition de résidus phénylalanine et glycine, qui permet la liaison des facteurs de transport lors du transport entre le noyau et le cytoplasme (revu dans Roth *et al.*, 1991). Le gène *NUP98* est le partenaire de fusion le plus fréquent des *HOX* : il forme des translocations le plus fréquemment avec *HOXA9* (Nakamura *et al.*, 1996; Borrow *et al.*, 1996), mais aussi avec *HOXD13* (Raza-Egilmez *et al.*, 1998), *HOXA13* et *HOXA11* (Fujino *et al.*, 2002), *HOXC11* et *HOXC13* (Taketani *et al.*, 2002). Dans chacune des protéines de fusion, la répétition de phénylalanines et glycines est conservée bien que son rôle ne soit pas entièrement caractérisé (revu dans Slake *et al.*, 2004). La translocation *NUP98-HOXA9* possède les domaines d'hétérodimérisation à PBX et de liaison à l'ADN de HOXA9 (Figure 1.2a). On a observé que cette translocation augmente la capacité de prolifération des cellules progénitrices dans la moelle osseuse (Lawrence *et al.*, 1999; Kroon *et al.*, 2001). De plus, lorsqu'on transplante ces cellules progénitrices, on induit des troubles myéloprolifératifs qui se développent ensuite en leucémie myéloïde aigue en 230 jours, en moyenne (Kroon *et al.*, 2001). Kroon *et coll.* (2001) ont démontré que, tout comme pour *HOXA9* (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001), des souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse exprimant *NUP98-HOXA9* et *MEIS1* développent une LMA plus rapidement (142 jours) que celles où seul *NUP98-HOXA9* est exprimé, démontrant une collaboration

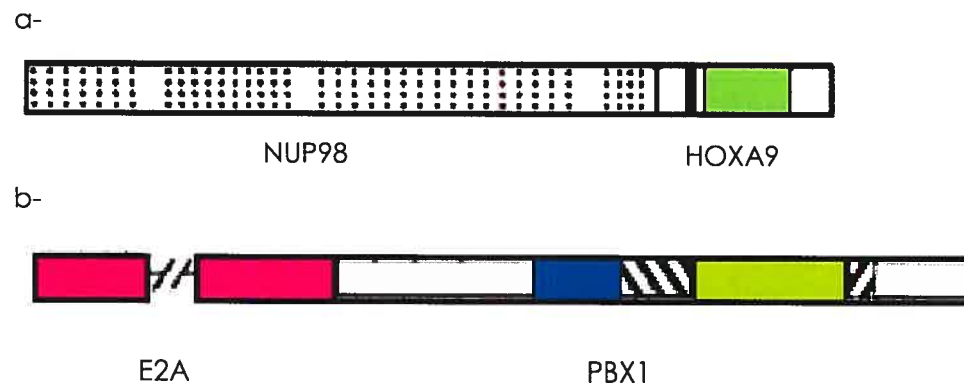


Figure 1.2. Représentation schématique des translocations NUP98-HOXA9 et E2A-PBX1a impliquées dans les leucémies. a) Modifié de Kroon et al., 2001; Nup98-HOXA9 possède les 38 répétitions phénylalanine-glycine (lignes pointillées) de NUP98 ainsi que l'homéodomaine (rectangle vert) et le domaine d'hétérodimérisation à PBX (rectangle noir). b) Modifié de Calvo et al., 2002; E2A-PBX1 implique la fusion du facteur de transcription E2A (rectangle fuchsia) avec PBX1. Le domaine d'hétérodimérisation à PBX (rectangle bleu), l'homéodomaine (HD, rectangle vert) ainsi que les hélices inhibitrices (rectangle hachuré à gauche de HD) et coopératives (rectangle hachuré à droite de HD) de PBX1 sont présents dans la translocation.

entre les deux oncogènes. De plus, la transformation des cellules NIH 3T3 par NUP98-HOXA9 n'est possible que s'il y a formation d'un complexe avec PBX1 (Kasper *et al.*, 1999).

E2A-PBX1 (t(1;19)(q23;p13.3), Fig1.2b) est une translocation chromosomique retrouvée dans approximativement 20% des LLA (leucémies lymphoïdes aigues) des cellules pré-B pédiatriques. Elle implique la fusion des gènes *E2A* et *PBX1* (Carroll *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1984). En temps normal, PBX1 collabore avec les HOX alors que le gène *E2A* code pour 2 isoformes d'un facteur de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix), E12 et E47 (nommés E2A ici afin d'alléger le texte) (Murre *et al.*, 1989). Aussi, E2A aurait en parallèle avec son rôle de facteur de transcription, un rôle de suppresseur de tumeur (Yan *et al.*, 1997). L'expression de *E2A* est détectable dans plusieurs tissus, mais se retrouve plus abondamment dans les tissus lymphoïdes où elle permettrait la spécification du type cellulaire ainsi que la maturation des cellules (Bain *et al.*, 1997a; Rutherford et LeBrun, 1998). *E2A* comprend deux domaines d'activation de la transcription, AD1 et AD2 (Activation Domain 1 et 2), qui se retrouve dans la translocation *E2A-PBX1* (Quong *et al.*, 1993). *E2A-PBX1* affecte la différenciation normale des cellules par sa capacité à interagir avec différentes protéines HOX et ainsi à lier l'ADN (Lu *et al.*, 1995). *E2A-PBX1* n'induit pas la leucémie lorsque surexprimé seul, mais accélère son développement lorsqu'il collabore avec d'autres oncogènes. Thorsteinsdottir *et coll.* (1999) ont démontré une forte collaboration oncogénique entre *E2A-PBX1* et *HOXA9* quant à leur capacité à altérer la prolifération de cellules de moelle osseuse de souris. De plus, le développement de la leucémie se fait beaucoup plus rapidement en présence des deux oncogènes (39 ± 2 jours, comparé à

80 et 167 jours respectivement pour HOXA9 et E2A-PBX1a). Ceci est aussi supporté par les récentes données démontrant que le locus *Hoxa* est souvent la cible d'intégrations virales dans un modèle murin de leucémie des cellules pré-B induite par *E2A-PBX1* (Bijl et al., 2005).

2. LA DROSOPHILE

2.1. La drosophile comme modèle d'étude

La drosophile est un modèle d'étude incomparable et de nombreux outils génétiques ont été développés afin de faciliter son utilisation en recherche comme par exemple, la découverte des éléments transposables P (Bingham et al., 1982). Plusieurs avantages en font un modèle de choix : temps de génération court (10 jours en conditions optimales), homologie entre son génome et celui humain, faible redondance génique, etc. Elle est aussi très utile pour l'étude des maladies humaines puisque 75% des gènes impliqués dans celles-ci possèdent une séquence homologue chez la drosophile (revu dans Bier, 2005). Les mécanismes de signalisation et les interactions entre leurs composantes sont aussi conservés entre la drosophile et les mammifères. Par exemple, la voie RTK-RAS-RAF-MAPK (Receptor Tyrosine Kinase - Rat Sarcoma- Rapidly growing Fibrosarcomas - Mitogen-Activated Protein Kinase) a grandement été étudiée et caractérisée dans plusieurs modèles d'étude. Cependant, des cribles génétiques à grande échelle chez la drosophile, difficilement réalisables chez les mammifères, ont permis de pousser encore plus loin les connaissances sur cette voie et d'identifier de nouvelles molécules qui y sont associées : les protéines d'échafaudage KSR (Kinase Suppressor of Ras) (Therrien et al., 1995) et CNK (Connector enhancer of KSR) (Therrien et al., 1998), qui possèdent

des homologues chez les mammifères, en sont des exemples. Les études les plus récentes démontrent que *KRAS* (Kirsten RAS) est muté dans 5% des LMA et que cette proportion monte jusqu'à 11% pour *NRAS* (Neuroblastome RAS) (Bowen et al., 2005). Ainsi, l'étude poussée des voies de signalisation chez la drosophile permet une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans le cancer.

2.2. Le système hématopoïétique de la drosophile

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse immunitaire et dans le développement du système hématopoïétique utilisant la drosophile comme modèle est en pleine expansion, si on se base sur le nombre de nouvelles publications disponibles sur Pubmed (32 publications pour 1985-1995 contre 159 pour 1996-2005, lorsque «*drosophila*, hemocytes» sert de critère de recherche). Plusieurs groupes de recherche ont mis en lumière les nombreuses analogies entre le système hématopoïétique de la drosophile et celui des mammifères, tant au niveau des événements moléculaires impliqués dans la différenciation et la prolifération des cellules hématopoïétiques, qu'au niveau des mécanismes de phagocytose (revu par Evans et al., 2003). Le système hématopoïétique de la drosophile est évidemment beaucoup plus simple que celui des mammifères, mais les similarités sont tout de même importantes. Dans les deux cas, le développement se fait en deux phases selon une régulation spatio-temporelle. De plus, les cellules de l'hémolymphe de drosophile, les hémocytes, présentent des similarités avec la lignée myéloïde des mammifères.

La réponse immunitaire de la drosophile est majoritairement innée. Sa défense contre les pathogènes est soit cellulaire (phagocytose,

encapsulation et mélanisation) ou humorale (peptides antimicrobiens) (Lanot et al., 2001). Par contre, de récentes études suggèrent la possibilité d'une réponse adaptative chez les insectes (Watson et al., 2005). Effectivement, cette équipe a démontré que les hémocytes présente un potentiel de phagocytose inférieur en absence de DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule), protéine membre de la superfamille des récepteurs immunoglobulines qui est exprimée par les hémocytes et les « fat bodies » (désormais traduit par « corps gras » dans le texte). On pourrait retrouvé jusqu'à 18 000 différents isoformes exprimées de DSCAM (Watson et al., 2005).

2.2.1 Développement du système hématopoïétique

Le système hématopoïétique de la drosophile se développe en deux phases (Figure 1.3.a). D'abord, on voit apparaître les hémocytes au stade 5 du développement embryonnaire au niveau du mésoderme procéphalique (Tepass et al., 1994; Rehorn et al., 1996). À la fin de l'embryogénèse, tous les hémocytes sont différenciés en plasmotocytes ou en cellules cristallines (voir section 2.3), et migrent dans l'ensemble de l'embryon (Tepass et al., 1994).

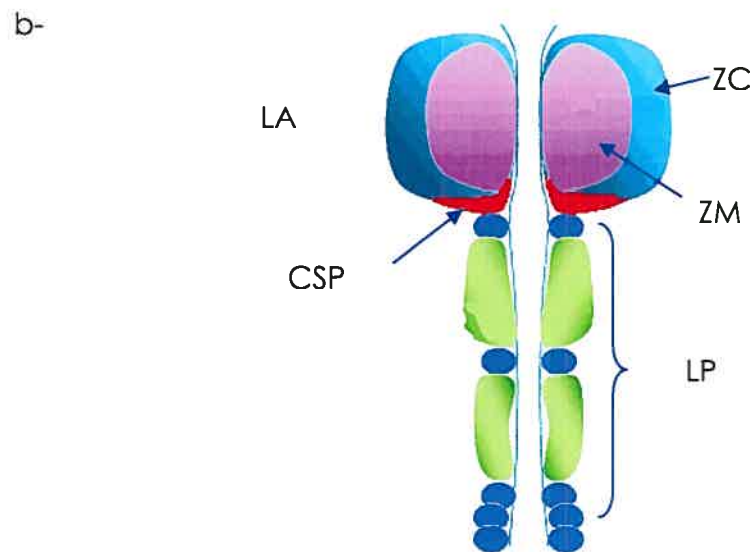
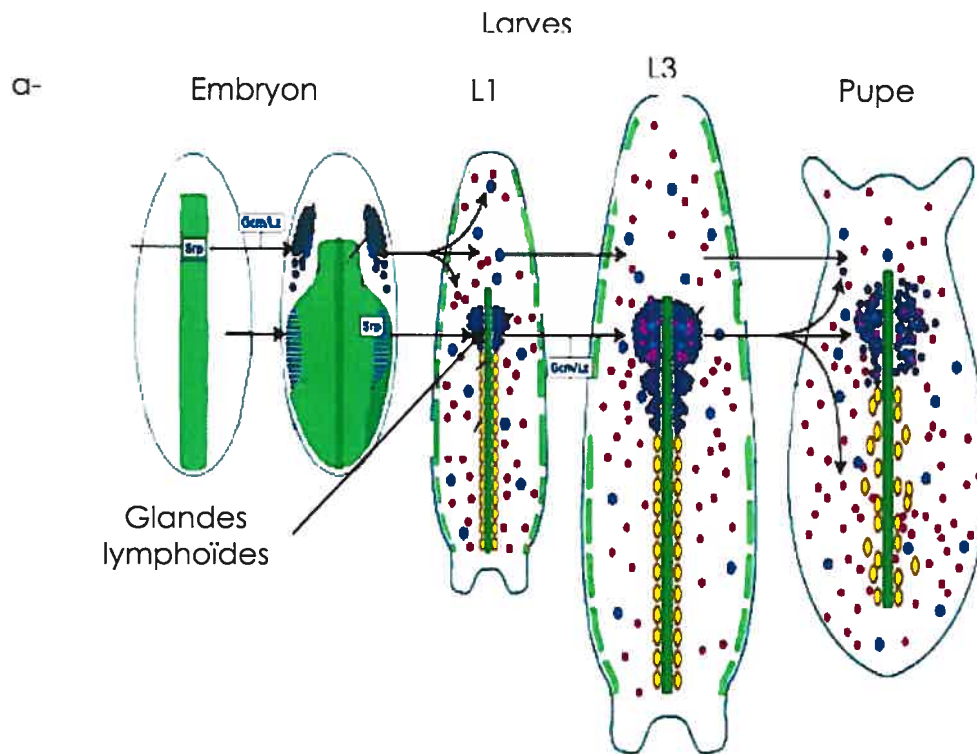


Figure 1.3 Système hématopoïétique de la drosophile. a) Modifié de Evans et al., 2003. Le développement du système hématopoïétique de la drosophile se fait en deux vagues: durant l'embryogénèse puis au stade larvaire, où se développent les glandes lymphoïdes. Lors de la formation de la puppe, les hémocytes sont relâchés et les glandes lymphoïdes sont dégradées. b) Modifié de Jung et al., 2005. Les glandes lymphoïdes de L3 sont divisées en lobes antérieurs (LA) et postérieurs (LP). Les lobes antérieurs (LA) comptent un centre de signalisation postérieur (CSP) qui permet le développement des hémocytes, une zone médullaire (ZM) où se trouvent les pro-hémocytes et une zone corticale (ZC), où se trouvent les hémocytes différenciés. Les lobes postérieurs (LP) sont composés de pro-hémocytes.

À la fin de l'embryogénèse, les glandes lymphoïdes, considéré comme le site principal de l'hématopoïèse, se développent à partir du mésoderme cardiogénique (Jung et al., 2005) et atteignent leur maturité chez les L3 (stade 3 du développement larvaire). Les hémocytes formés lors du développement larvaire sont largués dans l'hémolymphe juste avant la métamorphose, à la toute fin du stade L3 (Holz et al., 2003) (figure 1.3.a). Aussi, les hémocytes peuvent se disperser suite à l'infection de la larve; on remarque alors la dispersion des cellules des lobes antérieurs des glandes lymphoïdes, permettant aux hémocytes désormais en circulation de fournir une réponse immunitaire forte contre les parasites (Sorrentino et al., 2002).

Les hémocytes embryonnaires et larvaires procèdent à la phagocytose des débris cellulaires durant la métamorphose et persistent par la suite jusqu'au stade adulte, assurant défense immunitaire de la mouche adulte. Les glandes lymphoïdes se désintègrent lors de la métamorphose et aucun organe hématopoïétique n'est connu chez la mouche adulte (Lanot et al., 2001).

2.2.2 Types cellulaires

Rizki (1978) a décrit trois types cellulaires retrouvés dans le système hématopoïétique de la drosophile: les plasmacytes, les cellules cristallines et les lamellocytes (revu par Evans et al., 2003). D'autres types cellulaires ont été décrits, tels les podocytes (Shrestha et Gateff, 1986), mais, pour le moment, rien n'indique qu'il s'agit de lignées distinctes plutôt que des sous-populations des groupes mentionnés ci-dessus. Voici une brève description des trois types majeurs, soit les plasmacytes, les cellules cristallines et les lamellocytes.

D'abord, la vaste majorité de la population hémocytaire (environ 90%) est composée des plasmatoctes. Ce sont de petites cellules rondes capables de phagocyter les pathogènes et les débris cellulaires lors de la métamorphose. Les plasmatoctes ont aussi une fonction sécrétoire très importante : elles sécrètent des peptides antimicrobiens et des protéines de la MEC (matrice extracellulaire) comme la PXN (Peroxydase) et les protéines du collagène, tels DCg1 (*Drosophila* collagen 1) et VKG (Viking) (Fessler et al., 1994; Yasothornsrikul et al., 1997).

Les cellules cristallines comptent pour 5% de la population. Elles possèdent dans leur cytoplasme des inclusions enzymatiques caractéristiques, incluant entre autre la ProPo (Prophénoloxydase), capable de procéder à la mélanisation des corps étrangers (Rizki et al., 1985; Soderhall et Cerenius, 1998). Les cellules cristallines sont lysées en présence de ceux-ci, permettant le largage des enzymes dans le milieu et la mélanisation du corps étranger (Nappi et al., 2005). La ProPo est activée par une cascade enzymatique et, lorsqu'active, elle oxyde les phénols, entraînant leur polymérisation en mélanine et la production de radicaux libres qui tuent les pathogènes. La mélanisation favorise aussi la cicatrisation (Laifook, 1966; Ramet et al., 2002a).

Les lamellocytes sont de grosses cellules capables d'encapsuler les corps étrangers trop gros pour être phagocytés par les plasmatoctes. Elles ne sont pas présentes lors de la première vague de différenciation dans l'embryon et on ne les retrouve qu'en très faible quantité dans la larve. Par contre, suite à une stimulation immunitaire, par exemple une infection par un parasite, on remarque une différenciation massive des plasmatoctes et des prohémoctes en

lamellocytes (Lanot *et al.*, 2001). Les lamellocytes forment alors une capsule autour du corps étranger, puis les cellules cristallines procèdent à la mélanisation, conduisant finalement à la mort de ce dernier.

2.2.3 Organes du système hématopoïétique

On retrouve les hémocytes en trois différentes locations dans la larve : (i) en circulation libre dans l'hémolymph, (ii) adhérents aux organes et, surtout, à la paroi de la cuticule (nommés hémocytes sessiles) et (iii) dans les glandes lymphoïdes (Lanot *et al.*, 2001).

Comme mentionné plus tôt, les glandes lymphoïdes sont l'organe principal de l'hématopoïèse. Dès leur apparition à la toute fin du développement embryonnaire, les quelques cellules formant alors ces glandes expriment les facteurs de transcription *srp* (serpent) et *odd* (odd skipped) et ce, jusqu'à l'atteinte de la maturité (Jung *et al.*, 2005). Les glandes lymphoïdes matures se retrouvent dans la partie dorsale de la larve et sont composées de 4 à 6 paires de lobes (Figure 1.3b). Les lobes les plus antérieurs possèdent un ensemble de cellules sécrétoires, le CSP (centre de signalisation postérieur) qui exprime *SER* (Serrate), le ligand de la voie de signalisation Notch, ce qui permet l'expression de marqueurs cellulaires tel *Lz* (Lozenge) (Lebestky *et al.*, 2003). On différencie deux autres zones dans les lobes antérieurs : la zone médullaire, où se trouvent les pro-hémocytes et la zone corticale, où se trouvent des hémocytes matures qui expriment des marqueurs de différenciation (voir section 2.2.4). Les lobes secondaires ressemblent à la zone médullaire, donc on y retrouve seulement des pro-hémocytes (Jung *et al.*, 2005) (Figure 1.3.b).

Les corps gras sont dispersés dans l'ensemble de l'organisme et permettent à la larve une réponse humorale suite à une infection parasitaire en sécrétant quantité de peptides antimicrobiens (revu dans Bulet et al., 2004). Cette réponse immunitaire peut être dépendante ou non à l'hémolymphe (Bettencourt et al., 2004). La réponse dépendante à l'hémolymphe implique la présence des plasmacytes qui stimulent les corps gras en activant la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) via le ligand UPD-3 (Unpaired-3) (Agaisse et al., 2003). Par ailleurs, la réponse indépendante à l'hémolymphe implique la stimulation directe des corps gras par des molécules à la surface du pathogène, comme les peptidoglycans et l'acide lysothioïque.

La production de peptides anti-microbiens par les corps gras se fait par l'activation des voies de signalisation TL (Toll), dans le cas d'une stimulation de souches bactériennes Gram positives ou fongiques, ou IMD (Immune Deficiency), si la stimulation est causée par des bactéries Gram négatives (Anderson, 2000; Imler et Hoffmann, 2002; Khush et al., 2002; Hultmark, 2003; revu par Irving et al., 2004).

2.2.4 Signalisation moléculaires spécifiques

Chaque type cellulaire du système hématopoïétique de la drosophile exprime des molécules qui leur sont propres et qui leur permettent de se différencier ou d'exercer des fonctions particulières (Figure 1.4). L'expression du facteur de transcription *srp*, homologue de *GATA1*, est essentielle au développement des cellules hémocytaires de l'embryon et son expression dans les précurseurs permet la différenciation des plasmacytes et des cellules cristallines (Lebestky et

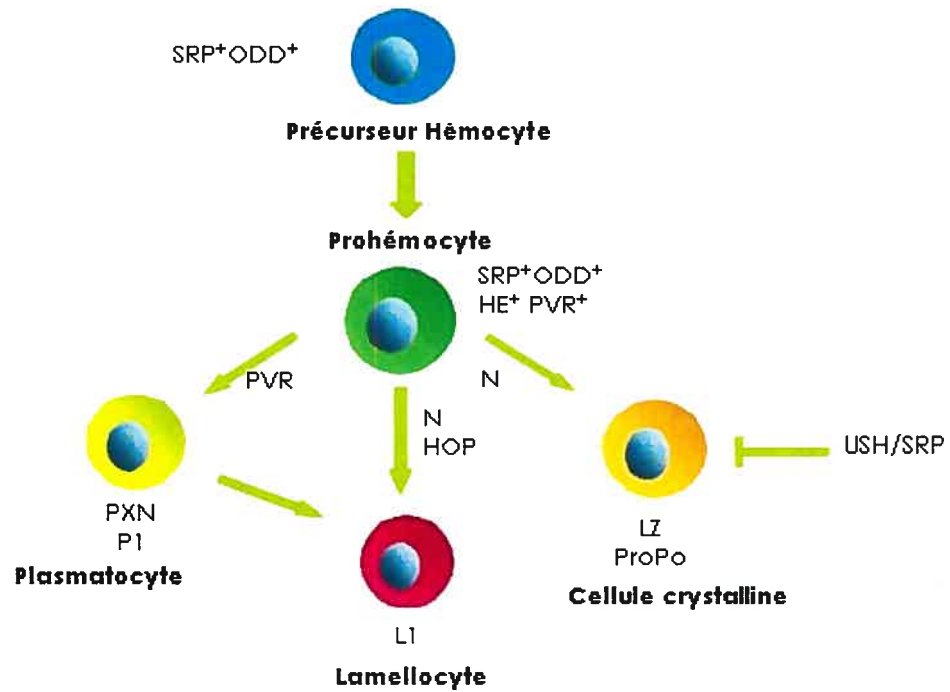


Figure 1.4 Marqueurs spécifiques aux hémocytes. Au fur et à mesure que les hémocytes deviennent matures, ils expriment des marqueurs spécifiques, tels P1, L1 et Lz qui sont spécifiques aux types cellulaires différenciés présents dans l'hémolymph.

al., 2000) et dans les corps gras, où il permet la réponse immunitaire (Petersen et al., 1999).

Les plasmacytes expriment de façon spécifique *gcm/gcm2* (glial cell missing), ce qui permet leur expansion et leur maturation (Bernardoni et al., 1997; Alfonso et Jones, 2002). SRP est essentiel à l'expression de *gcm/gcm2* (Lebestky et al., 2000). L'expression du récepteur tyrosine kinase *Pvr* (Poliovirus receptor), homologue aux récepteurs *PDGF* (Platelet-Derived Growth Factor) et *VEGF* (Vascular/Endothelial cell Growth Factor) des mammifères, assurerait aussi la différenciation des plasmacytes (Jung et al., 2005), de même que leur survie (Bruckner et al., 2004) (Figure 1.4).

L'expression de l'homologue de *RUNX1/AML1* (Runt Related Transcription Factor 1/Acute Myelogenous Leukemia 1), *Lz* (Lozenge) permet la différenciation des prohémyocytes en cellules cristallines. Ce facteur de transcription permet l'expression des gènes spécifiques à ce type cellulaire lorsqu'il coopère avec SRP (Waltzer et al., 2003). La protéine à doigt de zinc *USH* (U-Shaped), homologue de *FOG* (Friend of GATA) est exprimée dans les précurseurs hémyocytaires et les plasmacytes afin de prévenir leur différenciation en cellules cristallines (Sorrentino et al., 2005).

Plusieurs voies de signalisation sont très importantes pour le bon fonctionnement du système hématopoïétique. En voici quelques exemples. La voie de signalisation de Notch est très importante pour la différenciation des cellules cristallines (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003). Elle est aussi essentielle à la différenciation des lamellocytes, qui

nécessitent en plus la voie de signalisation JAK/STAT pour se différencier (Duvic *et al.*, 2002; Sorrentino *et al.*, 2004) (Figure 1.4).

Aussi, les petites GTPases de la famille RHO, RAC1 et RAC2, permettent la migration des hémocytes chez l'embryon (Paladi et Tepass, 2004) et lors d'une réponse inflammatoire (Stramer *et al.*, 2005). Les cascades de TL et IMD impliquent la production de peptides antimicrobiens lorsque stimulées par les homologues de NF κ -B (Nuclear Factor kappa B) (Ip et Levine, 1994; Meister *et al.*, 1997). Finalement, JAK/STAT stimule la réponse cellulaire et humorale (Agaisse et Perrimon, 2004; voir aussi les revues de Mathey-Prevot et Perrimon, 1998 et Evans *et al.*, 2003).

2.2.5 Modèles d'étude du système hématopoïétique

Le système hématopoïétique de la drosophile est utilisé depuis environ trois décennies pour l'étude des mécanismes impliqués dans les néoplasmes hématopoïétiques. Des cribles génétiques ont permis l'identification de différents gènes menant à des désordres du système hématopoïétique pouvant se rapporter à la leucémie (Gateff, 1978; Watson *et al.*, 1991; Torok *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1996; revu par Dearolf, 1998). Plusieurs désordres du système hématopoïétique ont été décrits : surprolifération cellulaire suite à des mutations dans des cascades de signalisation, réponse immunitaire contre le soi, formation de masses mélanotiques ou activation dérégulée de la cascade de mélanisation (Dearolf, 1998), ou encore problèmes de différenciation cellulaire (Sinenko *et al.*, 2004).

Un modèle très intéressant de surprolifération analogue à la leucémie a été mis au point par Asha *et coll.* (2003). En effet, cette

équipe a démontré que la surexpression de la forme activée de Ras (*Ras^{v12}*) dans le système hématopoïétique induit une surprolifération des hémocytes via la voie RAS-MAPK (Asha et al., 2003). Ces hémocytes sont fonctionnels et conservent leur capacité à proliférer lorsqu'injectés dans un récipient secondaire adulte. Un phénotype de surprolifération est aussi observé chez les mutants *ytr*, qui démontrent en plus un défaut de différenciation (Sinenko et al., 2004). YTR est une protéine exprimée dans le système hématopoïétique de façon conservée chez la drosophile et la souris (Sinenko et al., 2004).

La formation de masses mélanotiques chez la larve est facile à observer puisque la transparence de la larve permet une visualisation directe de ces masses (Figure 1.5). Il a été suggéré que la formation des masses mélanotiques résulte d'une réaction auto-immune des hémocytes contre les tissus nécrotiques ou d'une dérégulation des hémocytes qui s'attaqueraient de façon non-spécifique au soi (Watson et al., 1991). Par exemple, la mutation *tu-w* entraînerait un changement de la surface cellulaire des corps gras induisant une réponse immunitaire contre ceux-ci (Rizki et Rizki, 1979). Des mutations gain de fonction de *Tl* (Gerttula et al., 1988), *cactus* (Roth et al., 1991) et *hop* (*hopscotch*) (Luo et al., 1995) (Figure 1.5), de même que la mutation de LWR (Lesswright) (Huang et al., 2005), induisent la formation de masses mélanotiques. L'observation microscopique de ces masses suggère qu'il y ait accumulation de plusieurs couches de lamellocytes autour de celles-ci (Braun et al., 1998; Huang et al., 2005).



Figure 1.5 Formation de masses mélanotiques chez la larve. Photo de Dearolf, 1998, avec la permission d'Elsevier. Phénotype de masses mélanotiques induites par l'expression de la forme activée de HOP, HOPTUM-L.

Ces modèles de désordre associés au système hématopoïétique de la drosophile démontrent la validité de son utilisation comme système d'étude pour analyser les mécanismes impliqués dans le développement des leucémies.

2.3. Outils pour l'étude du système hématopoïétique

Cette section présente les techniques qui ont été décrites et qui permettent l'étude du système hématopoïétique de la drosophile.

2.3.1 Expression dans le système hématopoïétique

Le système UAS/GAL4 permet l'expression d'un gène d'intérêt de façon tissu- ou cellule-spécifique (Brand et Perrimon, 1993). Dans les tissus permettant son expression, GAL4 lie la séquence UAS (Upstream Activated Sequence) en aval du promoteur minimal de *hsp70* (*heat shock protein 70*), ce qui permet l'expression du gène d'intérêt. Voici quatre constructions qui permettent l'expression dans le système hématopoïétique : *Hml*-GAL4, *srp*-GAL4, *He*-GAL4 et *Cg*-GAL4 (Tableau 1.1).

D'abord, les séquences régulatrices de *Hml* (Hémolectine) permettent l'expression spécifiquement dans les plasmacytes et les cellules cristallines d'origine embryonnaire et larvaire. On retrouve aussi son expression dans les lobes antérieurs des glandes lymphoïdes des L3 (Goto *et al.*, 2003). HML est impliqué dans l'homéostasie et la coagulation, rôles conservés pour son homologue humain, le facteur von Willebrand (Goto *et al.*, 2003).

Séquence promotrice (Gène)	Patron d'expression cellulaire	Patron d'expression dans les organes
<i>Hml</i> (Hemolectine)	Sous population de plasmacytes et cellules cristallines	Lobes antérieurs des glandes lymphoïdes
<i>srp</i> (Serpent)	Plasmacytes et cellules cristallines	Hautement spécifique aux hémocytes
<i>He</i> (Hemese)	Dans 80% des hémocytes	Faiblement dans lobes antérieurs des glandes lymphoïdes
<i>Cg</i> (Viking et <i>DCg1</i>)	Hémocytes en circulation et sessiles, sauf lamellocytes	Lobes antérieurs des glandes lymphoïdes, corps gras

Tableau 1.1 Promoteurs du système hématopoïétique pouvant être utilisé avec le système d'expression UAS/GAL4. Le système d'expression UAS/GAL4 permet d'utiliser différents promoteurs pour permettre l'expression d'un gène d'intérêt. *Hml*-GAL4, *srp*-GAL4, *He*-GAL4 et *Cg*-GAL4 sont quatre constructions utilisant les séquences promotrices des gènes indiqués et qui permettent l'expression spécifiquement dans le système hématopoïétique. Ces séquences promotrices démontrent des différences quant au patron d'expression qu'elles permettent.

Ensuite, la région régulatrice de *srp* permet l'expression de GAL4 spécifiquement dans les hémocytes. Cette construction a permis l'expression dans le mésoderme procéphalique au stade embryonnaire 9, dans les cellules cristallines et les plasmotocytes (Bruckner *et al.*, 2004).

HE (Hemese) est une protéine transmembranaire qui se retrouve à la surface des hémocytes et qui joue un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire cellulaire (Zettervall *et al.*, 2004). La construction *He-GAL4* permet l'expression dans 80% des hémocytes en circulation et dans les hémocytes sessiles. Par contre, son expression est très faible dans les glandes lymphoïdes bien que la protéine HE y soit présente, probablement parce que la région promotrice utilisée pour la construction de *He-GAL4* ne possède pas tous les éléments régulateurs permettant de récapituler le profil d'expression naturel de la protéine (Zettervall *et al.*, 2004).

Asha *et coll.* (2003) ont utilisé les régions promotrices des gènes du collagène de type IV dans la construction *Cg-GAL4* (Collagen-GAL4). Deux séquences adjacentes codent pour le collagène de type IV chez la drosophile, soit *DCg1* (Natzle *et al.*, 1982) et *vkg*, exprimés dans les hémocytes et les corps gras (Yasothornsrikul *et al.*, 1997). Ainsi, la séquence régulatrice de ces deux gènes a été utilisée dans cette construction. L'expression se fait spécifiquement dans les hémocytes embryonnaires et larvaires en circulation, dans les lobes antérieurs des glandes lymphoïdes et dans les corps gras. Aucune expression n'a été détectée dans les lamellocytes (Asha *et al.*, 2003).

2.3.2 Visualisation rapide des hémocytes

Le traitement à la chaleur des larves permet la visualisation rapide et efficace des cellules cristallines (Rizki et al., 1980). En effet, un choc thermique de 10 minutes à 70°C sur les larves entraîne le noircissement spécifique des cellules cristallines suite à l'activation de la cascade de mélanisation, ce qui permet leur visualisation (Figure 1.6). Duvic et coll. (2002) ont utilisé cette technique pour quantifier le rôle de la voie de Notch sur la différenciation des cellules cristallines. Le choc thermique a aussi été utilisé pour visualiser les cellules cristallines dans les glandes lymphoïdes (Fossett et al., 2003).

Des anticorps spécifiques à chaque type cellulaire sont aussi disponibles. L'anticorps H2 est spécifique à HE et il reconnaît tous les types d'hémocytes en circulation, de même que l'ensemble des lobes des glandes lymphoïdes. Par contre, il ne reconnaît ni les hémocytes sessiles, ni les hémocytes embryonnaires (Zettervall et al., 2004). Un anticorps contre la protéine LZ permet la détection des cellules cristallines (Lebestky et coll., 2000). Finalement, l'anticorps L1 permet la détection spécifique des lamellocytes et l'anticorps P1 permet la visualisation des plasmotocytes. Les protéines reconnues par ces deux dernier anticorps n'ont pas été caractérisées (Asha et al., 2003).

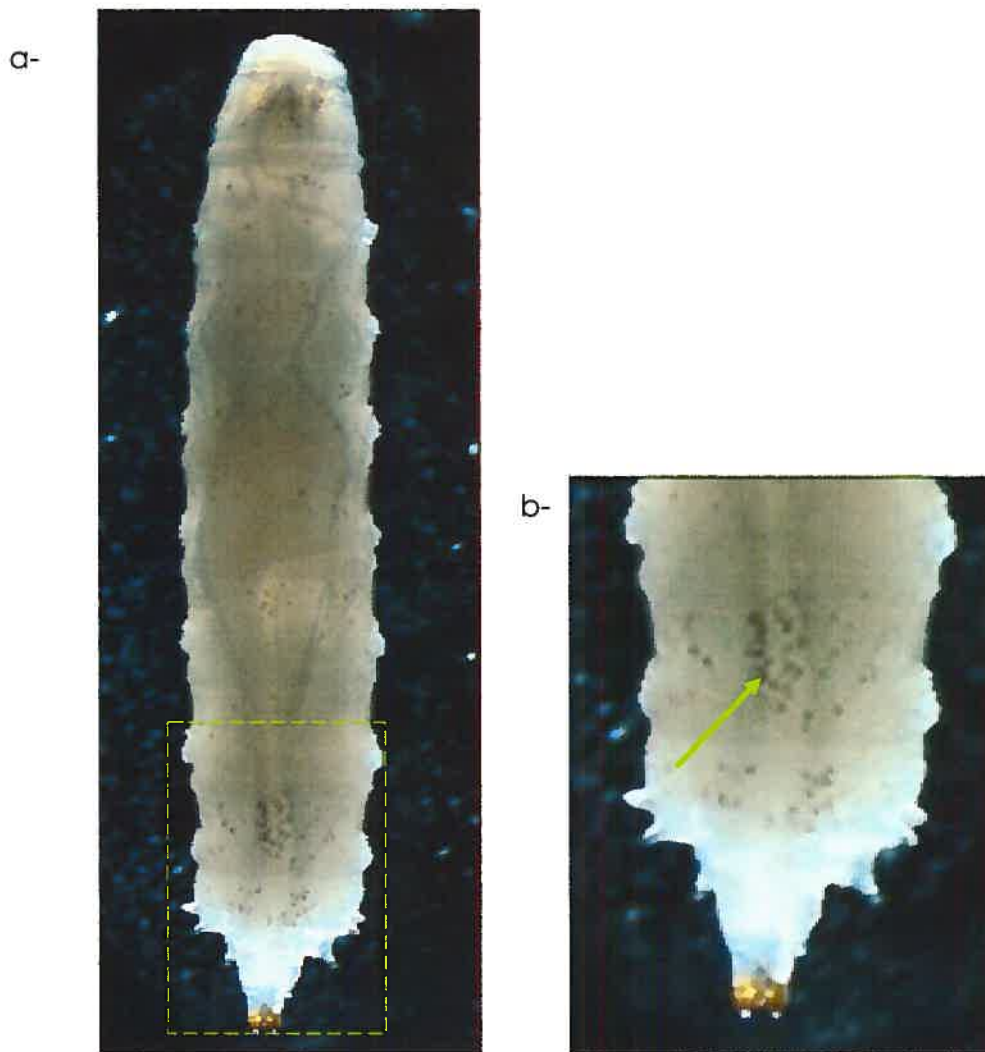


Figure 1.6 Visualisation des cellules du système hématopoïétique. Choc thermique sur les L3. Un choc thermique de 10 min à 70°C sur les larves entraîne la mélanisation des cellules cristallines qui deviennent ainsi visibles. a) On remarque que les hémocytes s'agrègent naturellement au niveau des lobes postérieurs de la larve. b) Un agrandissement des deux derniers segments abdominaux permet une meilleure visualisation des petites cellules mélanisées (cellules cristallines) (Flèche).

2.3.3 Compte cellulaire

La quantification des phénotypes dans le système hématopoïétique a souvent été décrite par le décompte du nombre de cellules (entre autre : Hedengren et al., 1999; Duvic et al., 2002; Asha et al., 2003; Zettervall et al., 2004). Le calcul du nombre de cellules par larve peut varier selon plusieurs facteurs; par exemple, selon la manière dont l'hémolymphe est extraite de la larve, comme démontré à la figure 1.7a, où les larves ont été soit transpercées (Asha et al., 2003), soit déchirées (Duvic et al., 2002). Aussi, le fait de différencier les phases précoce et tardive dans le développement des L3 augmente l'homogénéité des résultats (Zettervall et al., 2004) (Figure 1.7b).

2.3.4 Histochimie

L'histologie est grandement répandue pour l'étude des pathologies chez les mammifères puisqu'elle permet la visualisation de l'arrangement des structures microscopiques des organes. L'histologie s'applique aussi à la drosophile et s'avère pratique pour l'étude, par exemple, des structures de l'embryon ou de tissus adultes. Il est aussi possible de visualiser les structures internes de la L3 par histochimie. Les coupes sont colorées à l'H&E (Hématoxyline et Éosine) avec lequel les noyaux colorent violet et les structures cytoplasmiques, magenta (Figure 1.8).

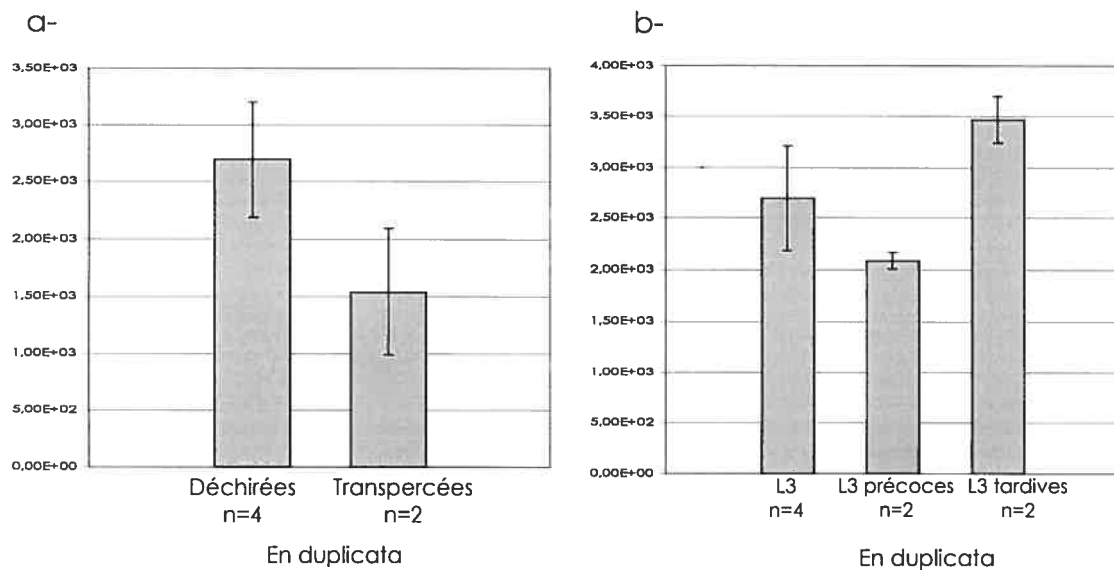
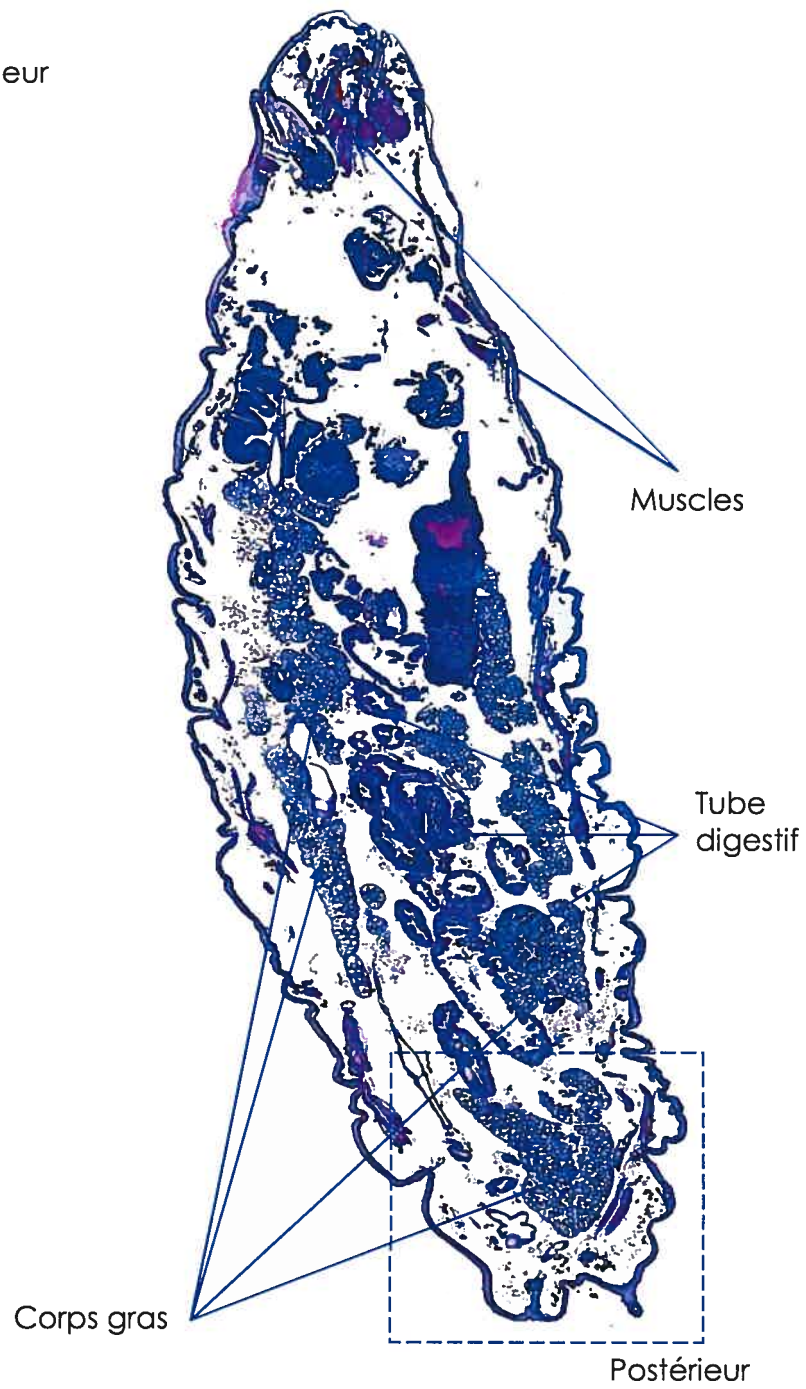


Figure 1.7 Compte cellulaire. Les hémocytes de cinq L3 ont été recueillis dans la solution de Ringer et colorées au DAPI. Les comptes des cellules DAPI positives ont été faits à l'hémacymètre. a) Différentes méthodes pour extraire les hémocytes permettent différents rendement; comparaison entre l'extraction des hémocytes en déchirant les larves ou en les transperçant. b) Le nombre d'hémocytes varie selon les stades de développement précoce et tardif des L3, distinguables grâce à la présence de colorant alimentaire dans le milieu nutritif (Voir Chapitre II : Matériels et Méthodes). Le nombre d'hémocytes en circulation est à son maximum juste avant le début de la métamorphose.

α-
Antérieur



b-

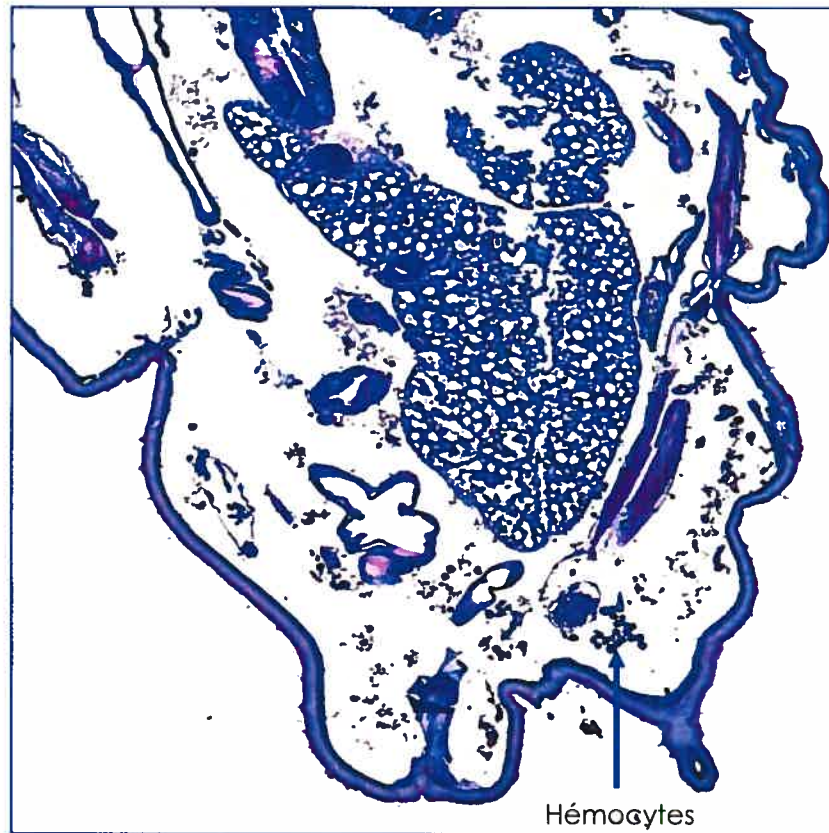


Figure 1.8 Histochimie sur les larves. Après avoir été fixées au xylène puis déshydratées dans l'éthanol, les larves ont été mises dans des blocs de paraffine, coupées au microtome et les coupes ont été colorées à H&E. Ceci nous permet d'apprécier différentes structures de la larve. a) Ensemble des structures observées sur une coupe d'une L3, par exemple le tube digestif, les muscles et les corps gras. b) Un agrandissement de la partie postérieure nous permet d'apprécier les hémocytes, petites cellules distinctes et plus foncées, qui ont tendance à s'y agréger.

2.3.5 Cytométrie de flux

Chez la drosophile, le FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) a été utilisé pour l'étude des récepteurs impliqués dans la phagocytose des bactéries Gram positive et négative (Ramet et al., 2002b) ou pour l'identification de nouveaux anticorps (Kurucz et al., 2003). Un essai permettant la sélection de populations spécifiques d'hémocytes viables, par exemple les plasmacytes, par FACS a été mis au point par Tirouvanziam et coll. (2004). Le fait que la concentration intracellulaire de glutathionne soit plus élevée dans les cellules immunes qu'ailleurs dans l'organisme (Sies, 1999) permet de séparer les hémocytes des débris sans utiliser d'anticorps.

On pourrait aussi utiliser les anticorps décrits à la partie 2.3.2 en cytométrie de flux pour caractériser les phénotypes induits par diverses mutations, comme on le fait pour l'étude du système hématopoïétique chez les mammifères.

2.3.6 Transfert d'hémocytes

Chez les mammifères, on transplante des cellules de moelle osseuse d'un individu dans un deuxième individu (récepteur secondaire) afin vérifier la capacité d'auto-renouvellement. Ceci permet, par exemple, de confirmer le caractère leucémique du phénotype de surprolifération observé chez le premier individu.

Il est aussi possible de transférer des hémocytes de L3 dans l'abdomen de mouches adultes (Asha et al., 2003) ou dans une larve (Tirouvanziam et al., 2004) et de suivre leur capacité à proliférer suite à la transplantation. Cet essai permet de vérifier qu'un phénotype est cellule-autonome ou non.

3. PRÉSENTATION DU PROJET

L'étude de la leucémie se fait principalement *ex vivo* dans des cellules en culture ou *in vivo* dans des organismes modèles mammifères, telle la souris. Ces systèmes d'étude ont en effet permis de mieux comprendre les leucémies. Par exemple, grâce à ces modèles, plusieurs des bases moléculaires et des anomalies génétiques sous-jacentes à la leucémie ont été décrites (revu par Cline, 1994; Gilliland et al., 2004) et, par conséquent, ont permis l'établissement de thérapies de plus en plus spécifiques et efficaces contre les leucémies (revu par Altucci et al., 2005; Robin et al., 2005). Malgré ces avancements, nous connaissons peu les processus moléculaires conduisant au développement de la leucémie. Des études fonctionnelles à grande échelle chez les mammifères qui permettraient l'identification des gènes impliqués, par exemple dans la leucémie, sont plutôt difficiles vu la lourdeur technique qu'impliquent ces modèles.

Je propose ici une toute nouvelle approche pour l'étude des processus moléculaires qu'impliquent les leucémies; soit l'utilisation de la drosophile comme outil génétique pour identifier des gènes collaborateurs/antagonistes de translocations humaines leucémogéniques. Pour y parvenir, j'ai construit des lignées transgéniques de drosophile portant les translocations humaine *E2A-PBX1 α* et *NUP98-HOXA9*. *E2A-PBX1 α* a été choisie parce qu'elle est fréquemment impliquée dans les LLA mais aussi pour les nombreuses connaissances acquises sur son rôle dans le développement des leucémies, alors que le choix de *NUP98-HOXA9* s'est fait vu l'expertise du laboratoire du Dr Guy Sauvageau sur l'implication des *HOX* dans le développement des leucémies. Le système d'expression UAS/GAL4 a permis leur expression

dans divers tissus. D'abord l'expression de *E2A-PBX1 α* et *NUP98-HOXA9* a été spécifiée dans le système hématopoïétique afin d'établir si ces translocations y induisent un phénotype spécifique. Puis, afin de vérifier s'il est possible de générer un phénotype ailleurs que dans le système hématopoïétique, j'ai exprimé les translocations au cours du développement de l'œil. Dans le futur, les phénotypes établis seront utilisables dans des cribles à grande échelle.

CHAPITRE II : Matériels & Méthodes

1. LIGNÉES DE MOUCHES

1.1. Culture des mouches

La culture des mouches et les croisements ont été faits selon les conditions standards, soit à 25°C, 50% d'humidité, dans un milieu nutritif de maïs granulé, mélasse, levure et agar. Lorsque les L3 devaient être différenciées entre précoces et tardives, du colorant alimentaire rouge était ajouté au milieu. En effet, juste avant de procéder à la pupaison, les L3 tardives éliminent le contenu de leur tube digestif. L'utilisation du colorant permet donc de distinguer les L3 précoces, dont le contenu du tube digestif est rouge et visible à travers la cuticule, des L3 tardives, dont le tube digestif est vide.

1.2. Lignées utilisées

Le Tableau 2.1 décrit les différentes lignées de mouches utilisées ainsi que leur provenance.

2. CONSTRUCTION DES LIGNÉES TRANSGÉNIQUES

2.1. Construction des plasmides et séquençage

pUAST-NUP98-HOXA9 a été construit en clonant le fragment EcoRI de MSCV-NUP98-HOXA9-pgkGFP (662) dans le vecteur pUAST (Brand et al., 1993). pUAST-E2A-PBX1a a été construit en clonant le fragment EcoRI de MSCV-pgkGFP-E2A-PBX1a sens (928) dans le vecteur pUAST (Brand et al., 1993). Dans les deux cas, les plasmides ont été séquencés dans l'orientation 5' et 3' du gène.

	Génotype	Génotype complet	Chromosome	Source
Promoteur Hémato- poïétique	Cg-GAL4	w[1118]; P{w[+mC]=Cg- GAL4.A}2	2	Bloomington, 7011
	Cg-GAL4, UAS-eGFP	w[1118]; Cg GAL4, UAS- eGFP	2	Cette étude
	Hml-GAL4, UAS-GFP.nls	w[1118]; P{w[+mC]=Hml- GAL4.G}6-4 P{w[+mC]=UAS- GFP::lacZ.nls}15.1	2	Bloomington, 6397
	srp- HemoGAL4, UAS-src-GFP	Srp HemoGAL4, UAS-src- GFP	?	N. Perrimon (Bruckner et al., 2004)
Promoteur Yeux	gmr-GAL4	w[*]; P{w[+mC]=GAL4- ninaE.GMR}12	2	Bloomington, 1104
	sE-GAL4/Cyo	w[1118]; P{sevEP-GAL4.B}7	2	Bloomington, 5793
	sev-GAL4	P{GAL4-Hsp70.sev}2/CyO; ry*	2	Bloomington, 2023
UAS	UAS-abdA	w[1118]; P{w[+mC]=UAS- abd-A.G}21.8	2	Bloomington, 912
	UAS-E2A- PBX1a	w[1118]; UAS-E2A-Pbx1a	2	Cette étude
	UAS-eGFP	w[1118]; P{w[+mC]=UAS- EGFP}5a.2	2	Bloomington, 5431
	UAS-GFP Hth/Cyo	UAS-GFP-Hth ⁷ /Cyo; MKRS/TM2	2	R. Mann (Casares et al. 1998)
	UAS-GFP Hth/Mkrs	(Cyo); 131GFP-Hth 5(3)/MKRS	3	R. Mann (Casares et al. 1998)
	UAS-Hth/TM6b	w[1118]; UAS-Hth ⁴ /TM6	3	H. Sun (Pai et al., 1998)
	UAS-Nup98- HoxA9 #3	w[1118]; UAS-Nup98-HoxA9 # 3	3	Cette étude
	UAS-Nup98- HoxA9 #4	w[1118]; UAS-Nup98-HoxA9 # 4	2	Cette étude
	UAS-NUP98- HOXA9 #5	w[1118]; UAS-Nup98-HoxA9 #5	2	Cette étude
	UAS-NUP98- HOXA9 #6	w[1118]; UAS-Nup98-HoxA9 #6	3	Cette étude
	UAS-NUP98- HOXA9/Cyo #8	w[1118]; UAS-Nup98- HoxA9/Cyo #8	2	Cette étude
	UAS-Ras ^{v12}	w[1118]; P{w[+mC]=UAS- Ras85D.V12}TL1	3	Bloomington, 4847

Tableau 2.1 Énumération des différentes lignées utilisées. Présentation du génotype, du positionnement sur le génome et de la source des différentes lignées de drosophile utilisées.

2.2. Microinjection

Des embryons de type sauvage w^{1118} (Canton-S) ont été collectés une heure après la ponte afin de s'assurer de l'homogénéité dans le stade de développement. Les embryons ont été déchorionés 1 min dans 3% hypochlorite de sodium, puis dessécher 10 min sur des granules de sulfate de calcium anhydre (Drierite). La microinjection a été faite dans la partie postérieure de l'embryon avec $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de plasmide + $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de plasmide-aide portant la transposase $\Delta 2-3$. Après 24h dans l'huile Volatex PCTFE (ATO), les L1 ont été transférées dans le milieu nutritif, et les mouches obtenues ont été croisées au type sauvage w^{1118} . L'intégration a été balancée et les mouches ont été croisées à elles-mêmes afin d'obtenir des lignées homozygotes (ou maintenues contre un chromosome balancier lorsque récessives létales).

2.3. Lignées portant deux intégrations

Les lignées portant deux transgènes ont été obtenues par recombinaison méiotique entre chromosomes homologues portant des intégrations distinctes. Les mouches ainsi obtenues ont été balancées et croisées entre elles afin d'obtenir des lignées homozygotes, lorsque possible. Voici la liste des lignées établies :

- i. *UAS-hth, UAS-NUP98-HOXA9*
- ii. *UAS-GFP-hth, UAS-NUP98-HOXA9*
- iii. *UAS-GFP-hth, UAS-Abd-B*
- iv. *UAS-E2A-PBX1a, UAS-NUP98-HOXA9*
- v. *UAS-Ras^{v12}, UAS-NUP98-HOXA9*
- vi. *Cg-GAL4, UAS-eGFP*

La lignée vi a été utilisée tout au long du projet parce qu'elle permet de visualiser les hémocytes rapidement par la présence de la GFP. La présence des constructions distinctes a été confirmée par PCR (Polymerase Chain Reaction) pour les lignées i, ii, iii, et iv, mais seule la lignée iv a été phénotypiquement testée lors d'essais de collaboration.

3. ANALYSE CELLULAIRE

La récolte de l'hémolymphe sur une lame de verre a été fait en transperçant (ou en déchirant, lorsque spécifié) la partie postérieure des L3 dans 50µl de tampon Ringer pour drosophile (182mM KCl, 46mM NaCl, 3mM CaCl₂ et 10mM Tris-Cl, pH 7,2); le tout se fait sur glace.

3.1. Compte cellulaire

Cinq L3 ont été transpercées ou déchirées sur un plat à dissection. L'hémolymphe recueillie dans le tampon Ringer est transférée dans un tube Eppendorf dans lequel on ajoute 0,5µg/ml DAPI. Après 5min d'incubation sur glace, 10µl de la solution a été déposée sur un hémacymètre. Les cellules DAPI positives ont été comptées à deux reprises avec un hémacymètre, selon les procédures habituelles.

4. ANALYSE DES LARVES

4.1. Choc thermique

Les L3 tardives ont été chauffées 10min à 70°C dans le tampon Ringer et les observations ont été faites à l'aide d'un stéréomicroscope. Pour quantifier le nombre de cellules visualisées par l'essai de choc thermique, le nombre de cellules mélanisées des deux segments abdominaux postérieurs de chaque larve ont été comptées.

4.2. Histochimie

Les L3 ont été fixées 10min dans xylène 100%, puis déshydratées successivement dans des bains de 25%, 50%, 75% et 100% éthanol. Les larves ont par la suite été mises dans la paraffine, coupées au microtome et colorées à H&E. Les coupes et colorations ont été effectuées par Denis Rodrigue, technicien de laboratoire du département de Pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal. Les observations ont été faites sur un microscope inversé.

5. ANALYSE DES MASSES MÉLANOTIQUES

5.1. Décompte des masses mélanotiques

Afin de faciliter la manipulation des L3, celles-ci ont été placées dans la solution de Ringer sur glace pour 2-3 heures avant de procéder. Les masses ont ensuite été dénombrées pour chaque larve sous un stéréomicroscope. Les masses noires bien définies de même que les agrégats brunâtres moins bien définies ont été dénombrées.

5.2. Dissection des masses

Les masses ont été extraites des larves à l'aide de pinces à dissection, puis mises dans la solution de Ringer. Elles ont été colorées au DAPI 0,5µg/ml pour 5min avant d'être observées au stéréomicroscope.

6. EXPRESSION DES ONCOGÈNES DANS LES YEUX

6.1. Croisement

Les lignées *UAS-NUP98-HOXA9* et *UAS-E2A-PBX1a* ont été croisées aux lignées *gmr-GAL4* (glass multiple repeat-GAL4), *sev-GAL4* (sevenless-GAL4) et *sE-GAL4* (sev Enhancer-GAL4). 2-3 jours après l'éclosion des

mouches, elles ont été transférées dans des tubes propres, sans levure, pour 1-2 jours avant de procéder à l'étude des yeux.

6.2. Préparation des échantillons et SEM

6.2.1. Préparation

Une dizaine de femelles dont ont été recueillies, tout en s'assurant que les yeux étaient propres et non abîmés. Elles ont été placées successivement dans 25%, 50%, 75% et 100% d'éthanol pour 8 heures pour chaque bain, ce qui assure leur déshydratation complète. Les femelles ont ensuite été placées dans des bains successifs de 25%, 50%, 75% et 100% fréon/éthanol pour 8 heures pour chaque bain afin de les dessécher.

L'échantillon doit être conducteur pour être détecté par le SEM (Scanning electron microscopy, ou microscope à balayage électronique), c'est pourquoi on le recouvre d'une fine couche d'Au/Pd (or/palladium). Les mouches ont donc été montées sur un disque de carbone avec de la colle à base de graphite colloïdal (MecaLab Ltd), en s'assurant que l'œil sera perpendiculaire à l'objectif lorsqu'observé au SEM. On procède ensuite au dépôt AuPd sur l'échantillon.

6.2.2. SEM

Les photographies d'œil de mouches ont été prises avec un SEM de type JEOL JSM-840 mis à notre disposition par le Centre de Caractérisation Microscopiques des Matériaux ((CM)²) de l'École Polytechnique de Montréal.

CHAPITRE III : Résultats

1. LIGNÉES TRANSGÉNIQUES

La microinjection de *UAS-NUP98-HOXA9* a permis d'obtenir cinq lignées transgéniques : lignée #3, 4, 5, 6, et 8. Par contre, une seule lignée a été obtenue pour *UAS-E2A-PBX1a*, malgré les efforts pour en obtenir d'autres. L'intégration d'un transgène dans le génome se fait par la transposase de façon aléatoire et l'activité transcriptionnelle du site d'intégration génomique entraîne une certaine variabilité dans l'expression de celui-ci, et par conséquent, une certaine variation dans le phénotype. Ainsi, il est souvent important d'obtenir plus d'une intégration afin de s'assurer que le phénotype observé est spécifique au transgène mais aussi afin d'obtenir une gamme d'intensité phénotypique.

Le tableau 3.1 résume les caractéristiques de chaque intégration ainsi que leur phénotype de viabilité et de croissance sous le contrôle de Cg-GAL4. On remarque que le phénotype varie effectivement selon l'intégration de *UAS-NUP98-HOXA9* : les intégrations #3, 4 et 5 permettent aux larves de se développer en adulte, malgré un ralentissement du développement. Par contre, l'intégration #6 a un phénotype unique qui ralentit de façon dramatique la croissance des larves, qui ne se développent que très rarement et difficilement en L3. L'intégration #8 s'avérerait moins intéressante puisqu'elle est homozygote létale et que, lors de croisements, ceci entraîne deux populations : l'une portant le transgène, l'autre portant le balancier. La différenciation au niveau larvaire de ces deux populations étant plus complexe, je me suis donc concentrée sur les autres intégrations. L'expression des transgènes sous le contrôle de la construction *Hml-GAL4* ne semble pas affecter ni la viabilité ni la croissance des larves (données non-présentées).

Intégration	Homozygote viable	Chromosome	Létalité (Cg-GAL4)	Croissance (Cg-GAL4)
NUP98-HOXA9 #3	+	3	-	Ralentie
NUP98-HOXA9 #4	+	2	-	Ralentie
NUP98-HOXA9 #5	+	2	-	Ralentie
NUP98-HOXA9 #6	+	3	+	Jusqu'à L2
NUP98-HOXA9/Cyo #8	-	2	-	N.D.
E2A-PBX1 α	+	2	-	Normal

Tableau 3.1 Données phénotypiques des intégrations de *UAS-NUP98-HOXA9* et *UAS-E2A-PBX1 α* . Les lignées sont toutes homozygotes viables, sauf *NUP98-HOXA9/Cyo* #8. En présence du promoteur Cg-GAL4, la croissance des larves est dramatiquement ralentie pour toutes les lignées; elles finissent toutes par atteindre le stade adulte, sauf l'intégration #6 pour laquelle les larves ne se rendent que très rarement au stade L3 et n'atteignent jamais le stade adulte. Le rythme de croissance de l'intégration #8 n'a pas été déterminé (N.D.). La croissance des larves portant *E2A-PBX1 α* semble similaire à celle du type sauvage.

2. EXPRESSION DE TRANSLOCATIONS LEUCÉMOGÉNIQUES DANS LE SYSTÈME HÉMATOPOÏÉTIQUE DE LA DROSOPHILE

2.1 Phénotype cellulaire

Les voies de signalisation RAS, JAK/STAT et TL influencent le nombre d'hémocytes en circulation chez la drosophile (Luo *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 1998; Asha *et al.*, 2003). Des études précédentes ont montré que l'expression dans le système hématopoïétique de mutations gain de fonction de certaines de leurs composantes induisent une surprolifération cellulaire et, dans certain cas, une augmentation de la quantité de lamellocytes en circulation (Luo *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 1998; Asha *et al.*, 2003).

J'ai donc, dans un premier temps, vérifier si l'expression de *NUP98-HOXA9* et *E2A-PBX1a* spécifiée au système hématopoïétique entraîne une surprolifération comme celle observée par l'expression de *Ras^{v12}* (Asha *et al.*, 2003). J'ai d'abord vérifié si je pouvais reproduire la surprolifération induite par *RAS^{v12}*. Les observations obtenues sont qualitativement comparable à ce qui a été démontré (Asha *et al.*, 2003), i.e. il y affectivement surprolifération du nombre d'hémocytes en présence de *RAS^{v12}* comparé à *w¹¹¹⁸* (Figures 3.1b et 3.2a et b), malgré que le dénombrement à l'hémacymètre (Figure 3.1a) soit moins important que ce qui avait été observé (augmentation de 4X ici comparé à 40X). Ceci peut s'expliquer par les faits que deux lignées portant des intégrations différentes de *Ras^{v12}* aient été utilisées. J'ai aussi tenté de quantifier par compte cellulaire à l'hémacymètre les phénotypes induits par l'expression de *NUP98-HOXA9* sous le contrôle

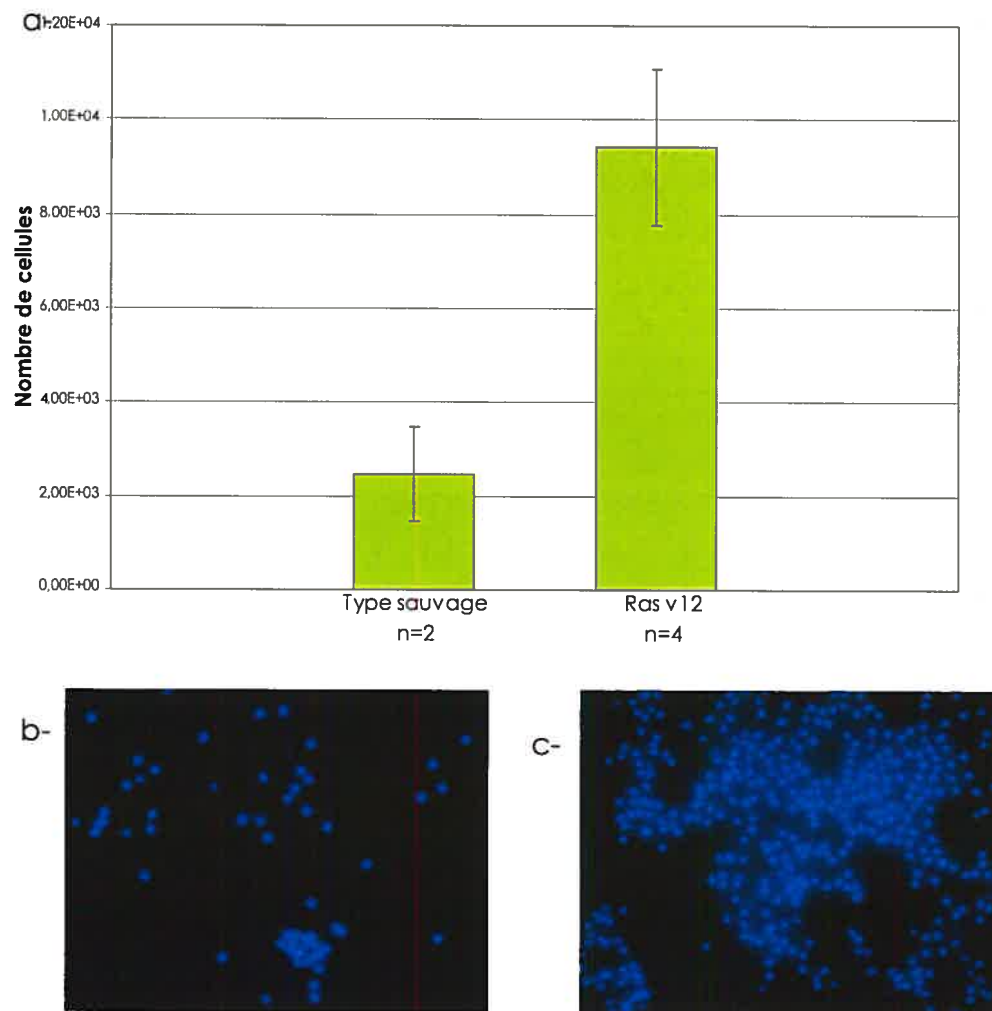


Figure 3.1 Surprolifération cellulaire induite par RAS^{v12} . a) Décompte des cellules DAPI positives à l'hémacymètre pour le type sauvage et pour l'expression Ras^{v12} sous le contrôle du promoteur Cg-GAL4, on observe une augmentation de 4X par rapport au type sauvage w^{1118} . Visualisation des hémocytes de type sauvage (b) et $UAS-Ras^{v12}$ (c) sous contrôle de Cg-GAL4, colorés au DAPI.

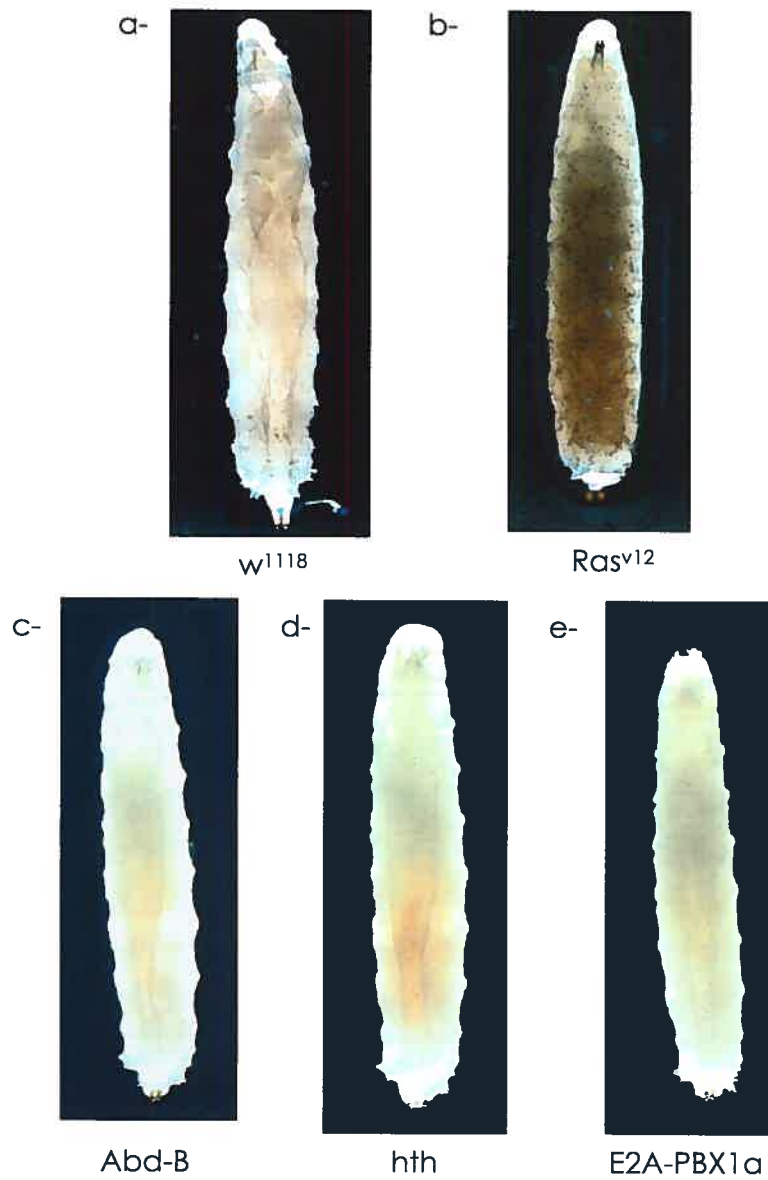


Figure 3.2 Choc thermique en présence de Cg-GAL4 et *Ras^{v12}*, *Abd-B*, *hth* ou *E2A-PBX1a*. a) Type sauvage *w¹¹¹⁸*. b) L'expression de *Ras^{v12}* induit une surprolifération cellulaire marquée. Il semble y avoir une diminution du nombre de cellules mélanisées en présence de ABD-B (c), HTH (d) et E2A-PBX1a (e).

des constructions *Hml*-GAL4 et *Cg*-GAL4 (données non présentées). Toutefois, la variabilité entre les essais empêche de tirer des conclusions significatives.

Afin de quand même avoir une quantification préliminaire du phénotype cellulaire induit, j'ai procédé au décompte des cellules mélanisées dans les deux derniers segments abdominaux de la partie postérieure des larves ayant subies un choc thermique (Duvic et al., 2002). Malgré qu'on obtienne ainsi un bon indice quant au nombre d'hémocytes, on ne peut se baser sur ce décompte pour une quantification exacte. En effet, ce type de décompte ne tient compte que des cellules cristallines qui deviennent noires par mélanisation et qui se trouvent à la partie postérieure des L3, omettant les cellules se retrouvant ailleurs dans l'organisme et ne pouvant procéder à la mélanisation. En présence de *Hml*-GAL4, les larves *w¹¹¹⁸* ont 56.9 ± 36.4 cellules mélanisées dans les deux derniers segments postérieurs ($n=9$) alors que les larves *NUP98-HOXA9* en ont 57.9 ± 35.6 pour l'intégration #3 ($n=8$), 45.5 ± 22.5 pour #4 ($n=11$), 31.3 ± 31.8 pour #5 ($n=10$) et 36.1 ± 22.7 pour #6 ($n=11$) (Figure 3.3). Ainsi, sans toutefois pouvoir conclure de façon définitive, il semble généralement y avoir une diminution du nombre de cellules mélanisées. Le dénombrement de ces cellules dans les larves exprimant les intégrations de *NUP98-HOXA9* sous le contrôle de *Cg*-GAL4 ayant subi un choc thermique s'est avéré très variable dû à la présence de masses mélanotiques (voir Section 2.2). En effet, les masses et les hémocytes qui s'agrègent sur celles-ci semblent empêcher une récolte reproductible de l'hémolymph, rendant ardu un décompte fiable. Par contre, chez les larves exprimant *E2A-PBX1a* sous le contrôle de *Cg*-GAL4, il est possible de procéder au décompte puisque les

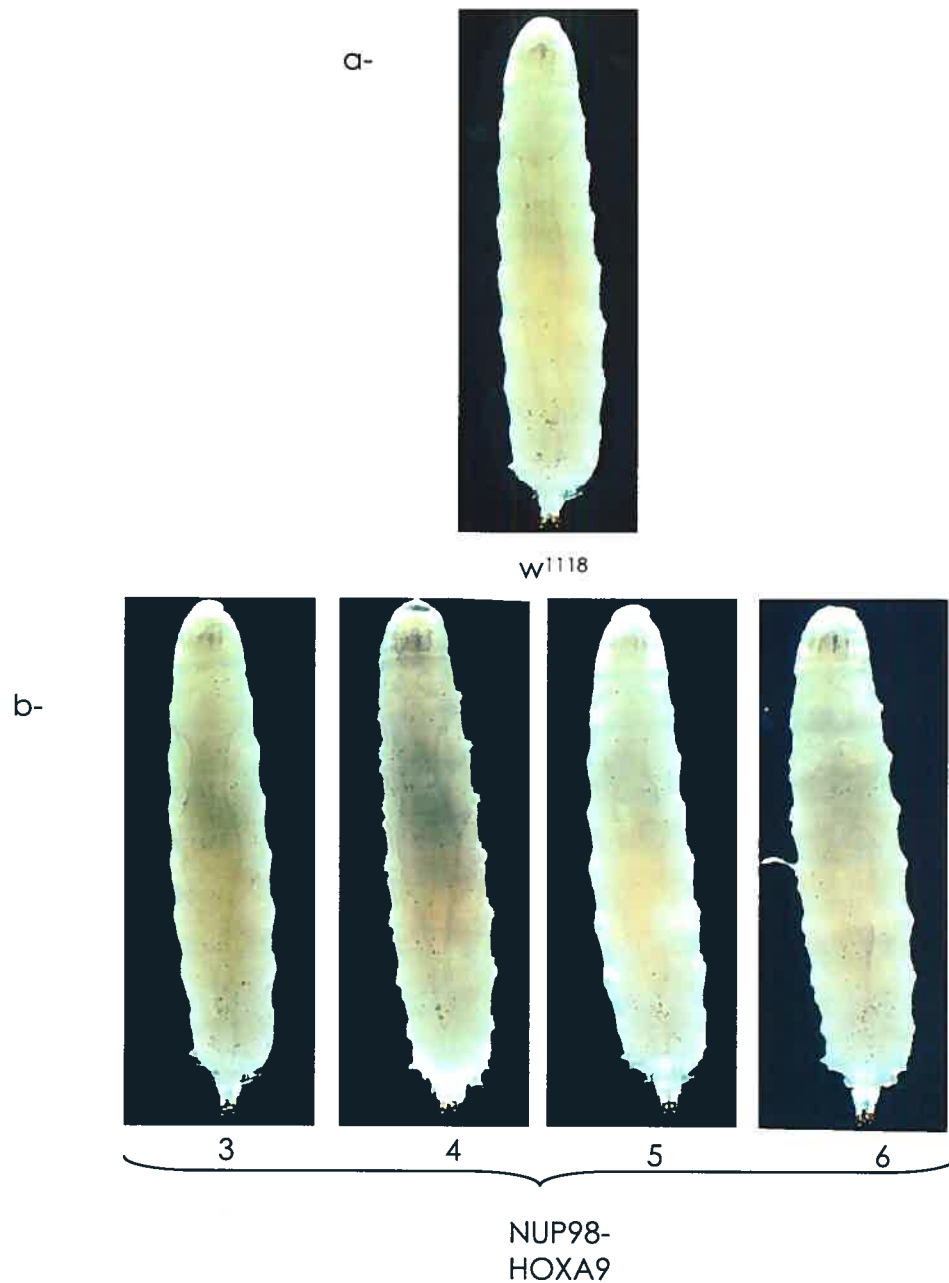


Figure 3.3 Choc thermique en présence de Hml-GAL4 et des différentes intégrations de *NUP98-HOXA9*. L'expression de *NUP98-HOXA9* avec le promoteur *Hml-GAL4* semble induire une légère diminution du nombre de cellules (b) comparé au type sauvage w¹¹¹⁸ (a). La formation de masses mélanotiques n'a pas été observée.

masses sont beaucoup moins fréquentes. Ainsi, il y a diminution du nombre de cellules des segments abdominaux postérieurs lorsque les larves sont traitées à la chaleur (72.2 ± 71.2 cellules mélanisées pour w^{1118} , $n=10$ comparé à 59.8 ± 34.3 pour E2A-PBX1a, $n=5$) (Figure 3.2e).

2.2 Formation des masses mélanotiques

Plusieurs mutations ont été associées à un phénotype de masses mélanotiques (Perotti et Bairati, Jr., 1968; Rodriguez *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2005), dont la mutation gain de fonction dans la kinase JAK appelée HOP (*hop^{Tum-I}*; *hop^{tumorous lethal}*) (Hanratty et Ryerse, 1981; Asha *et al.*, 2003).

De façon fort intéressante, l'expression de la translocation *NUP98-HOXA9* entraînent le développement de masses mélanotiques (Figure 3.4b), qui se forment presque exclusivement au stade L3. Cependant, l'expression de *NUP98-HOXA9* sous le contrôle de *Hml-GAL4* n'entraîne pas la formation de masses mélanotiques (Figures 3.3b). Quoique la raison demeure inconnue, on peut penser que la différence les promoteurs *Cg-GAL4* et *Hml-GAL4* proviennent soit d'une différence entre leur niveau d'expression ou encore du fait que l'expression est dirigée dans différents types cellulaires (voir Chapitre IV).

La fréquence de développement de ces masses dans les larves exprimant les différentes intégrations de *NUP98-HOXA9* sous le contrôle de *Cg-GAL4* s'avère très impressionnante (Figure 3.5). Le dénombrement de ces masses permet de comparer le phénotype induit par les différentes intégrations. L'intégration #3 entraîne la formation de masses dans 27.8% des larves observées avec une moyenne de 4.8 masses/L3. Le phénotype le plus fort est observé avec

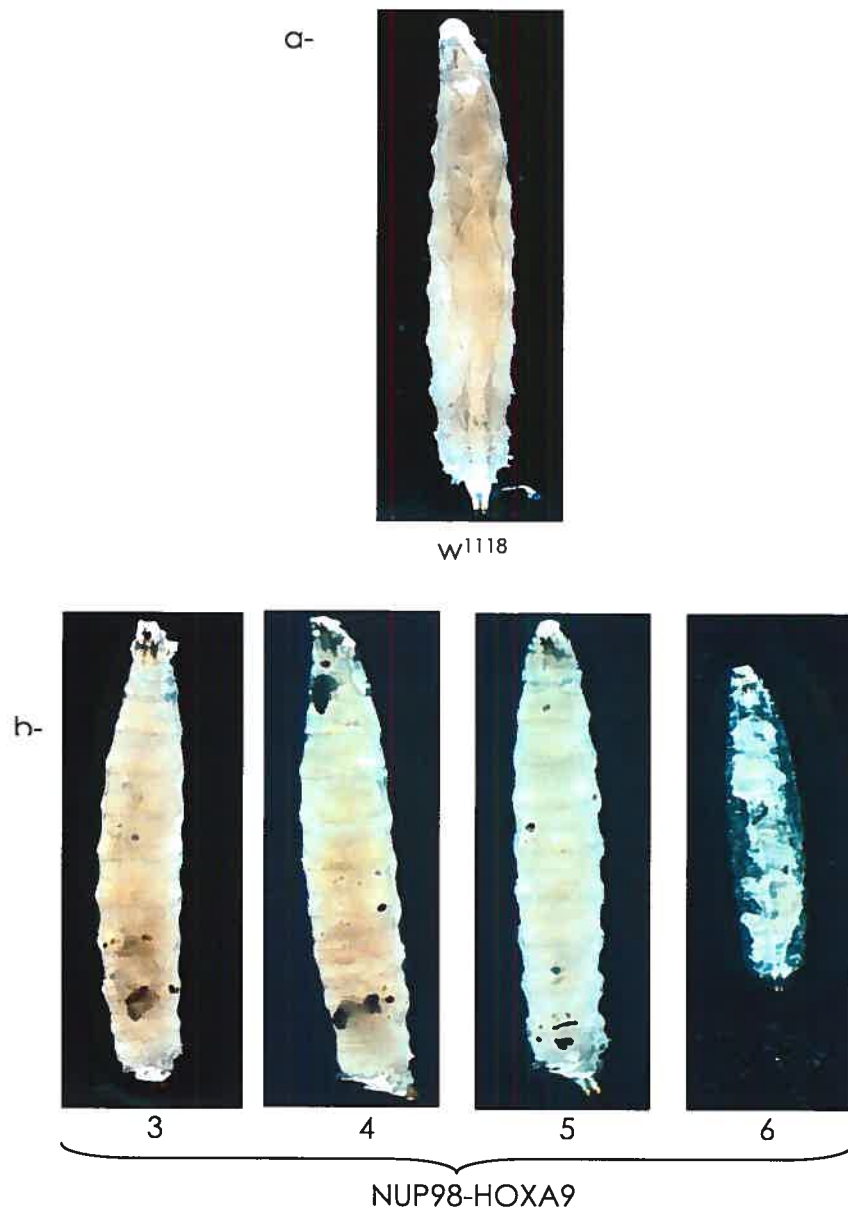


Figure 3.4 Choc thermique en présence de Cg-GAL4 et des différentes intégrations de *NUP98-HOXA9*. a) Type sauvage w¹¹¹⁸. b) Pour les intégrations # 3, 4 et 5, on observe la formation de masses mélanotiques alors que le développement est grandement affecté pour l'intégration #6.

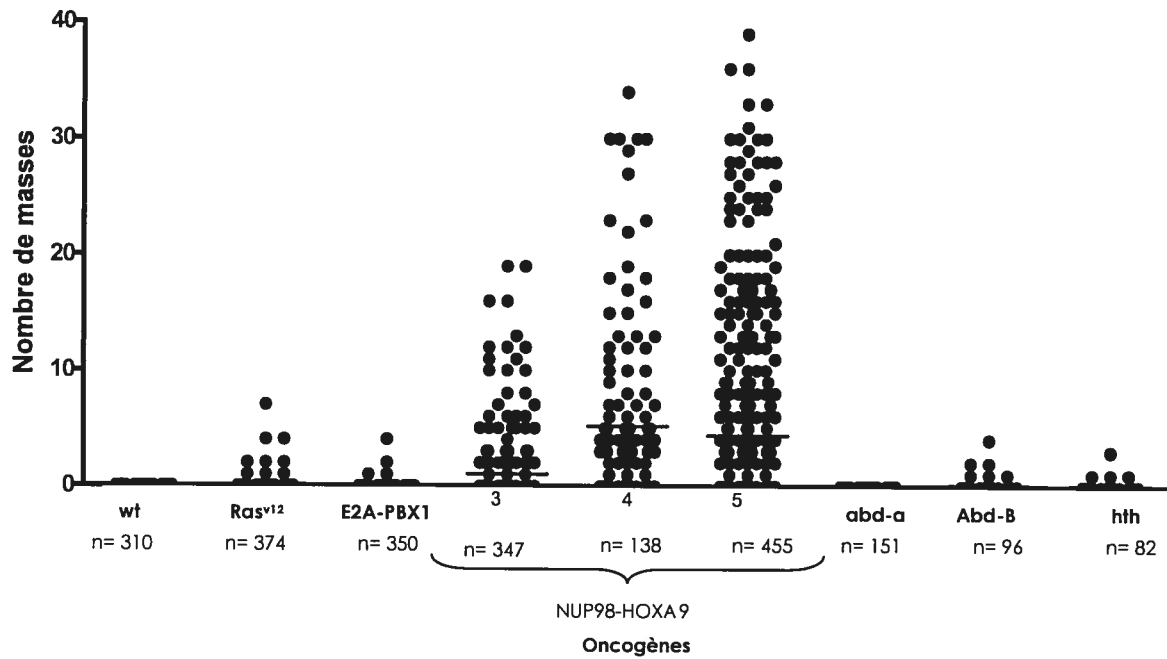


Figure 3.5 Décompte des masses mélanotiques. Chaque point sur le graphique représente une larve portant le nombre de masses correspondant sur l'axe des y. Comparaison des phénotypes induits par l'expression de *E2A-PBX1a* et des intégrations 3, 4 et 5 de *NUP98-HOXA9* avec *Ras^{v12}*. Aussi, le décompte a été fait pour *abd-A*, *Abd-B* et *hth*. Les comptes ont été faits lorsque l'expression des oncogènes est sous le contrôle de Cg-GAL4. Pour les intégrations de *NUP98-HOXA9*, $p < 0.0001$; pour *E2A-PBX1a* $p = 0.08$; pour les collaborateurs *Abd-B* et *hth* $p < 0.05$.

l'intégration #4 qui indique que 72.9% des larves sont affectées, portant en moyenne 12.6 masses/L3. Finalement, l'intégration #5 induit la formation de masses dans 37.5% des cas avec en moyenne 9.2 masses/L3. Comme le développement en L3 est très rare dans le cas de l'intégration #6, je n'en ai pas tenu compte pour cet essai. Lors du décompte de ces masses, j'ai aussi observé qu'il n'y a pas formation de masses chez le type sauvage w^{1118} en présence de Cg-GAL4. L'expression de Ras^{v12} sous le contrôle de Cg-GAL4 induit la formation de masses mélanotiques dans 7.1% des larves observées avec une moyenne de 1.5 masses/larves, en plus du phénotype de surprolifération déjà décrit (Asha *et al.*, 2003) (Figure 3.5). Finalement, l'expression de *E2A-PBX1a* induit aussi la formation de masses mélanotiques à faible fréquence (8% des larves, 1.3 masses/L3 en moyenne, Figure 3.5) mais les données préliminaires sur le nombre de cellules vont à l'opposé du phénomène de surprolifération observé avec RAS^{v12} (Figure 3.2b et e).

2.3 Analyse du phénotype de masse mélanotique vs celui de surprolifération

Le développement des masses mélanotiques peut être induit suite à une surprolifération cellulaire (Luo *et al.*, 1995; Asha *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Ce ne semble pas être le cas lorsque *NUP98-HOXA9* est exprimé.

Pour déterminer ceci, j'ai procédé à la comparaison des phénotypes induits par RAS^{v12} et *NUP98-HOXA9*. D'abord, on remarque que RAS^{v12} induit vraiment une augmentation du nombre de cellules individuelles (Figures 3.1b, 3.2b et 3.6a), alors que les hémocytes semblent agglomérés au niveau des masses dans les larves *NUP98-*

HOXA9 (Figure 3.6b). Par contre, l'analyse de masses mélanotiques disséquées de larves *Cg-GAL4, UAS-eGFP* (enhanced-GFP) et *UAS-NUP98-HOXA9* n'indiquent pas que celles-ci soient vraiment cellulaires (Figure 3.7). En effet, les cellules semblent se retrouver autour de la masse et non pas à l'intérieur (Figure 3.7b). Il est important de noter, par contre, que la mélanine produite par la masse (Figure 3.7a) est un chromophore qui absorbe les photons émis entre les longueurs d'onde de 280 à 500nm (Paquet et al., 2005) et que le colorant DAPI et la GFP, respectivement, absorbent la lumière à 340nm et 488nm et émettent à 488nm et 509nm. Ainsi, la mélanine empêche probablement la visualisation du DAPI et de la GFP.

3. EFFETS DES COLLABORATEURS CONNUS DE HOXA9

Chez la souris, il existe des modèles démontrant que différents oncogènes interagissent entre eux, ce qui augmentent leur pouvoir de transformation. Par exemple, *NUP98-HOXA9* et *MEIS1* surexprimés réduisent le temps de latence du développement de la leucémie (Kroon et al., 2001), et le même phénomène est observé lorsque *E2A-PBX1a* est surexprimé avec *HOXA9* (Thorsteinsdottir et al., 2001).

a-



b-



Figure 3.6 Histochemie sur les L3. L'histochimie sur les L3 permet de bien différencier le phénotype de surprolifération de celui de masse mélanotique, grâce à la coloration H&E. a) Surprolifération induites par RAS^{v12} en présence du promoteur Cg-GAL4. b) L'expression de *NUP98-HOXA9* sous le contrôle du promoteur Cg-GAL4 implique la formation de masses mélanotiques.

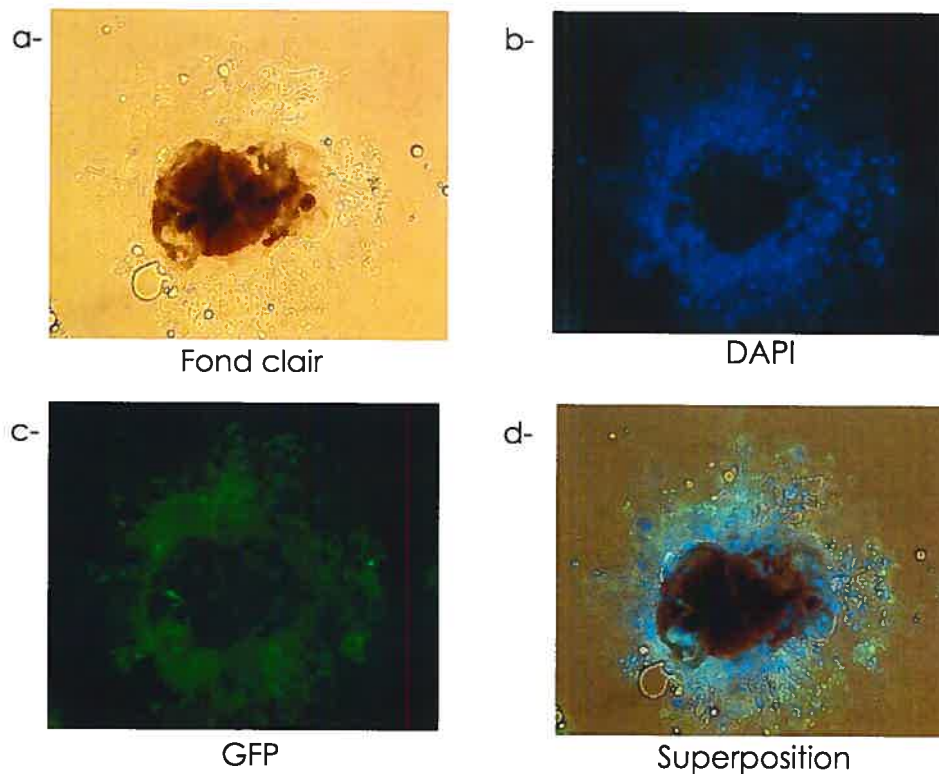


Figure 3.7 Dissection d'une masse mélanotique d'une larve *Cg-GAL4*, *UAS-eGFP*; *UAS-Nup98-HoxA9*. a) Sur fond clair, on peut remarquer la mélanisation de la masse par la couleur brunâtre. b) La coloration nucléaire DAPI laisse croire que la masse n'est pas cellulaire, mais la mélanine pourrait empêcher la visualisation de la coloration, où la mélanine est la plus dense. c) L'expression de la GFP dans les hémocytes démontre qu'il y a une réponse immunitaire contre les masses mélanotiques, comme décrit dans la littérature. On ne peut affirmer que la masse soit un agrégat de cellules hémocytaires puisque la mélanine pourrait avoir le même effet sur la GFP que sur le DAPI. d) Superposition des trois images.

3.1. Phénotypes seuls

Dans le but de vérifier si les oncoprotéines humaines exprimés chez la drosophile ont conservé leur capacité à interagir fonctionnellement avec leurs collaborateurs, j'ai construit par recombinaison méiotique des lignées de drosophile comportant deux transgènes. Leur capacité à collaborer pourra donc être testée par co-expression dans un tissu donné à l'aide de construction GAL4. Les lignées obtenues sont : 1) *UAS-NUP98-HOXA9*; *UAS-E2A-PBX1 α* ; 2) *UAS-NUP98-HOXA9*; *UAS-hth* (homologue de Meis); 3) *UAS-NUP98-HOXA9*; *UAS-Ras^{v12}*; 4) *UAS-hth*; *UAS-AbdB* (homologue de HoxA9). La présence des deux transgènes dans les lignées a été confirmée par PCR.

Comme aucune étude n'a démontré le rôle de ces protéines dans le système hématopoïétique de la drosophile, j'ai d'abord déterminé l'effet des nouveaux transgènes lorsqu'exprimés seul sous le contrôle de Cg-GAL4. L'expression de *abd-A* ne semble pas affecter le système hématopoïétique. Aucun phénotype n'a été observée lorsque testé par choc thermique (données non présentées) et aucune masse mélanotique n'a pu être observée (Figure 3.5).

L'expression de *Abd-B* et *hth* sous le contrôle du promoteur Cg-GAL4 semble affecter le système hématopoïétique. Effectivement, le nombre de cellules mélanisées dénombrées dans les lobes postérieurs est de 28 ± 20 pour ABD-B (n=8) et 18.6 ± 17.9 pour HTH (n=6) comparé à 72.2 ± 71.2 pour *w¹¹¹⁸* (n=10) (Figure 3.2a, c et d). Pour ABD-B, on observe aussi la formation de masses mélanotiques dans 7.3% de la population avec en moyenne 1.3 masses/L3 alors qu'on en observe 9.3% chez les larves exprimant HTH, avec une moyenne de 1.6 masses/L3. Ces

données sont comparables à ce qui est observé en présence de E2A-PBX1a (8%, 1.3 masse/L3) (Figure 3.5).

3.2. Coopération de NUP98-HOXA9 et ses collaborateurs

Les lignées portant les transgènes susceptibles d'interagir (voir Chapitre II, Section 2.3) ont été générées, mais seule la capacité de collaboration entre NUP98-HOXA9 et E2A-PBX1a a été testée pour l'instant.

Les données préliminaires recueillies (non quantifiées) démontrent que le phénotype de NUP98-HOXA9 est augmenté en présence de E2A-PBX1a. En effet, dans les lignées portant *NUP98-HOXA9* et *E2A-PBX1a*, on observe une exacerbation du phénotype de masses mélanotiques lorsque ces deux transgènes sont co-exprimées sous le contrôle de Cg-GAL4 (Figure 3.8).

4. DÉVELOPPEMENT DE L'ŒIL

Dans le but de vérifier la possibilité d'établir un phénotype ailleurs que dans le système hématopoïétique, j'ai utilisé trois constructions qui permettent l'expression spécifiquement lors du développement de l'œil pour y exprimer les translocations *E2A-PBX1a* et *NUP98-HOXA9*. La première construction utilisée est *sev-GAL4*, qui possède les régions régulatrices contrôlant l'expression du récepteur tyrosine kinase *sev* (Fortini et al., 1992) fusionnée à la séquence codant pour GAL4. La seconde construction est *sE*, qui consiste en la fusion de deux séquences « enhancer » de *sev* avec le promoteur minimal de *hsp70* (Dickson et al., 1992). Celle-ci est utilisée avec le système d'expression UAS/GAL4 (Ruberte et al., 1995). Ces constructions permettent l'expression dans les

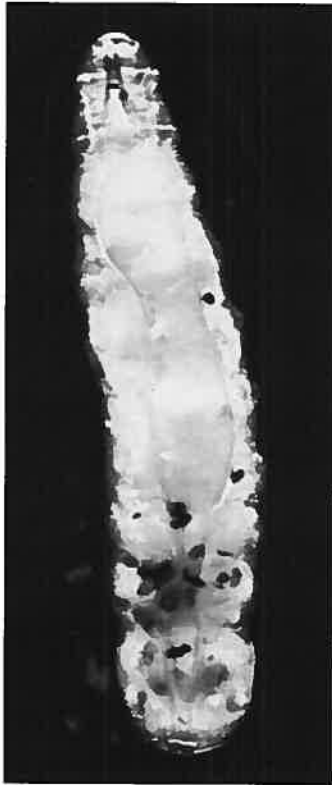


Figure 3.8 Collaboration entre deux oncogènes : Co-expression de *E2A-PBX1 α* et *NUP98-HOXA9* sous le contrôle de *Cg-GAL4*. Lorsqu'exprimés ensemble, *E2A-PBX1 α* et *NUP98-HOXA9* induisent un phénotype plus sévère que lorsqu'ils sont exprimés seuls : il semble y avoir plus de masses mélanotiques et leur contour semble mieux défini. À noter que, contrairement aux autres L3 présentées précédemment, celle-ci n'a pas subi de choc thermique.

précurseurs des cellules R7 et cônes et dans les cellules R3 et R4 de l'œil en développement. Finalement, j'ai utilisé la lignée *gmr-GAL4*, qui consiste en cinq répétitions de l'élément de réponse liant Glass (Freeman, 1996), un facteur de transcription à doigt de zinc (Moses et Rubin, 1991). *gmr-GAL4* permet d'exprimer spécifiquement dans la plupart des cellules de l'œil au cours de leur différenciation.

D'abord, l'expression des intégrations #3, 4, 5 et 6 de *NUP98-HOXA9* et de *E2A-PBX1a* sous le contrôle de *sev-GAL4* n'affecte pas le développement de l'œil (données non-présentées). *sev-GAL4*, qui a un niveau d'expression plus fort que *sev-GAL4*, est létal pour les intégrations #5 et 6 mais n'induit aucun phénotype dans l'œil pour les intégrations #3 et 4 de *NUP98-HOXA9*, ni pour *E2A-PBX1A* (données non-présentées). Par contre, l'expression des oncogènes sous le contrôle de *gmr-GAL4* cause un défaut au cours du développement de l'œil, résultant en un œil adulte rugueux (Figure 3.9). Il y a une certaine variabilité entre le niveau de rugosité entre chaque intégration de *NUP98-HOXA9*, les plus fortes étant les intégrations #5 et 6. La Figure 3.9b représente le phénotype induit par l'intégration #5. L'expression de *E2A-PBX1a* induit de façon peu fréquente une faible désorganisation (Figure 3.9c). À noter que l'expression de *GAL4* par *gmr* induit une certaine rugosité dans l'œil, comme démontré à la Figure 3.9a (Kramer et Staveley, 2003).

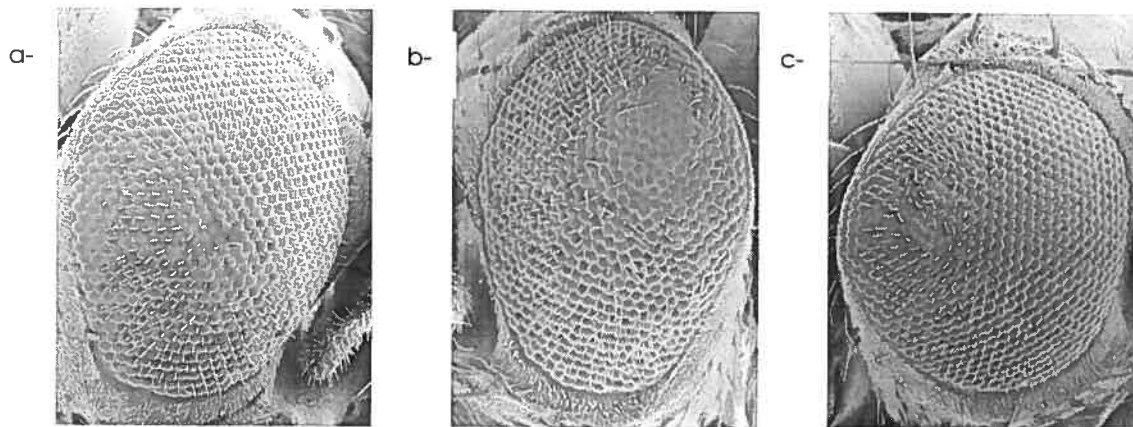


Figure 3.9 Désorganisation du développement de l'œil suite à l'expression de *NUP98-HOXA9* ou *E2A-PBX1a* sous le contrôle de *gmr-GAL4*. L'observation des yeux de drosophile est faite au SEM. a) Œil de type sauvage en présence de *gmr-GAL4*. b) L'expression de *NUP98-HOXA9* induit un défaut dans le développement de l'œil qui pourra être exploité lors d'un crible génétique. Représentation de l'intégration #5. c) Le phénotype induit dans l'œil par *E2A-PBX1a* est faible et peu fréquent.

CHAPITRE IV : Discussion

1. LES TRANSLOCATIONS

Le but de mon projet est d'utiliser la drosophile comme outil génétique afin d'identifier des gènes collaborateurs/antagonistes des translocations humaines *E2A-PBX1a* et *NUP98-HOXA9* impliquées dans les leucémies. Pour ce faire, j'ai premièrement construit des lignées de drosophile portant les ADNc de ces translocations. En second lieu, j'ai utilisé le système UAS/GAL4 pour cibler l'expression de ces translocations dans le système hématopoïétique et dans l'œil de la drosophile.

Le choix des translocations s'est effectué selon les connaissances acquises grâce aux études chez les mammifères. D'abord, la translocation *NUP98-HOXA9*, retrouvée dans les LMA, s'avère très intéressante puisque le gène *NUP98* est fréquemment impliqué dans des translocations conduisant au développement de la leucémie (Slape *et al.*, 2004), mais aussi parce qu'elle possède une partie du gène *HOXA9*. On sait que les *Hox* sont très importants dans le développement du système hématopoïétique des mammifères et que ceux-ci sont très bien conservés entre les mammifères et la drosophile, tant au niveau structurel que fonctionnel. Il est donc vraisemblable que les mécanismes d'action des *Hox*, en conditions normales ou de néoplasie, soient aussi conservés. Ensuite, *E2A-PBX1* a été choisie vu son implication fréquente dans les LLA (Carroll *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1984). Tout comme pour les *Hox*, *Pbx1* est aussi conservé au niveau structurel et fonctionnel, ce qui laisse présager des mécanismes moléculaires similaires chez les mammifères et la drosophile.

2. MODÈLE DE LEUCÉMIE

2.1. Analyse du phénotype : Développement de masses mélanotiques

L'expression de *NUP98-HOXA9* grâce à Cg-GAL4 conduit au développement fréquent de masses mélanotiques dans les larves (Figures 3.4b et 3.5). Celles-ci sont également observées lors de l'expression de *E2A-PBX1a* mais à un taux moindre (Figure 3.5). L'apparition de ces masses a été décrite pour des mutations dans des gènes des cascades TL et JAK/STAT (Perotti *et al.*, 1968; Rodriguez *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2005), bien que les masses en tant que telles n'aient pas été caractérisées. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'élément déclencheur qui entraînerait leur formation. D'abord, il se pourrait qu'un défaut au niveau des corps gras, par exemple une expression aberrante des protéines à la surface des cellules, déclenche une réaction auto-immune contre ceux-ci, entraînant leur mélanisation et la formation des masses (Dearolf, 1998). Les masses mélanotiques peuvent aussi être formées par l'agrégation des hémocytes lorsqu'il y a surprolifération cellulaire (Huang *et al.*, 2005).

Les données semblent indiquer que, dans le cas présenté ici, le défaut se situe probablement au niveau des corps gras. Effectivement, le phénotype de masses mélanotiques s'observe en présence de Cg-GAL4 (Figure 3.4b), dont l'expression est spécifique aux plasmotocytes et aux cellules cristallines, mais aussi aux corps gras. Les masses mélanotiques n'ont pas été observées lorsque *NUP98-HOXA9* est exprimée sous le contrôle de *Hml-GAL4* (Figure 3.3b), spécifique aux plasmotocytes et aux cellules cristallines seulement (Tableau 1.1). Par contre, ceci pourrait s'expliquer par le fait que *Hml-GAL4* induit une

expression à dose plus faible que Cg-GAL4, selon des tests d'expression de la GFP (données non-présentées). Afin de déterminer si le phénotype de masses mélanotiques est attribuable à un désordre affectant les corps gras, on pourrait induire l'expression des translocations avec des constructions spécifiques aux corps gras et non exprimées dans les hémocytes. Les lignées *e16E-GAL4* ou *Lsp2-GAL4* pourraient être utilisées à cette fin.

Comme mentionné ci-dessus, les masses mélanotiques peuvent aussi être causées par un phénomène d'agrégation cellulaire. J'ai donc investigué la composition de ces masses. L'histochemie sur des L3 entières semble indiquer que les masses sont formées de cellules agrégées (Figure 3.6b). Pour confirmer ceci, j'ai disséqué les masses de larves exprimant la GFP spécifiquement dans les hémocytes et les corps gras (sous le contrôle de Cg-GAL4). L'intérieur de la masse ne semble permettre la coloration par DAPI, ni la visualisation de la GFP (Figure 3.7b et c). Ceci indique que la masse n'est peut-être pas un agrégat cellulaire, à moins que la mélanine produite prévienne la visualisation du DAPI et de la GFP. Ainsi, ces deux résultats quelque peu contradictoires ne permettent pas de déterminer la composition des masses. Par contre, on peut affirmer que la masse stimule une réponse immunitaire, puisqu'on observe la formation de couches d'hémocytes autour de la masse (Figure 3.7c); il est bien probable qu'il s'agisse de lamellocytes (Braun *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005). L'étude de la composition de la masse pourra être approfondie par immunohistochemie. On pourra ainsi vérifier que la masse consiste en un agrégat d'hémocytes (grâce au marqueur H2) et identifier quels types cellulaires sont recrutés avec les marqueurs spécifiques aux différents types cellulaires (P1 est le marqueur

spécifique des plasmacytes, Lz des cellules cristallines et L1 des lamellocytes, voir Figure 1.4).

Il sera aussi très intéressant de vérifier si l'expression des translocations induit un phénotype au niveau des glandes lymphoïdes. Il a été démontré que des mutations dans *mcx* provoquent la surcroissance des glandes lymphoïdes ainsi que leur mélanisation. Ainsi, il est probable que l'expression d'une translocation à homéodomaine ait un effet sur le développement de cet organe.

2.2 Comparaison du comportement des translocations chez la drosophile vs chez les mammifères

Chez les mammifères, *E2A-PBX1a* et *NUP98-HOXA9* sont impliquées de façon différente dans le développement des leucémies, ce qui peut expliquer les différences phénotypiques observées chez la drosophile. Des études chez la souris ont démontré que la présence de la translocation *E2A-PBX1a* permettait d'accélérer le développement de la leucémie en présence de *HoxA9* (Thorsteinsdottir *et al.*, 1999), mais elle ne semble pas avoir la capacité à transformer les cellules lorsqu'elle est seule. Ce phénomène de collaboration pourrait aussi être nécessaire chez la drosophile. Pour confirmer cette hypothèse, le phénotype induit par la co-expression de l'homologue de *HoxA9*, *Abd-B*, avec *E2A-PBX1a* devra être étudié. Des résultats préliminaires de co-expression de *E2A-PBX1a* avec *NUP98-HOXA9* semblent démontrer qu'effectivement, le phénotype de masses mélanotiques de *NUP98-HOXA9* est exacerbé en sa présence (Figure 3.8).

Par contre il est important de noter que le faible phénotype induit par *E2A-PBX1a* pourrait être causé par des problèmes d'ordre plus

technique. D'abord, une seule intégration de *E2A-PBX1a* a pu être obtenue. On sait que l'activité transcriptionnelle du site d'intégration d'un transgène peut influencer l'expression de celui-ci. Ainsi, il est difficile de confirmer que le faible phénotype soit spécifique à *E2A-PBX1a* et non pas plutôt causé par un faible niveau d'expression dû à la localisation du transgène. Aussi, l'expression d'une protéine humaine dans un autre organisme, ici la drosophile, peut impliquer des problèmes lors de l'expression de celle-ci, soit parce qu'elle est incompatible avec la machinerie transcriptionnelle ou parce qu'elle est instable. Ainsi, l'expression des translocations devra être caractérisé et validée.

2.3 Confirmation du phénotype leucémique

Pour confirmer le caractère leucémique du modèle établi, il faudrait vérifier la capacité d'auto-renouvellement de la masse lorsque transplantée chez un récipient secondaire. La transplantation de cellule du système hématopoïétique de drosophile dans un récipient secondaire, adulte ou larvaire, a été décrit précédemment (Asha *et al.*, 2003; Tirouvanziam *et al.*, 2004). Ainsi, les équipes qui ont procédé à ce genre d'essai ont établi la capacité de prolifération des cellules, ce qui représente l'un des caractères spécifiques des cellules leucémiques chez les mammifères. Par contre, aucune étude ne démontre l'utilisation de cellules provenant de masse mélanotique pour ce genre de transfert, mais l'injection d'hémocytes en circulation pourra aussi être testée.

3. COLLABORATION

Afin de s'assurer de la spécificité d'action des translocations utilisées dans la drosophile, j'ai voulu savoir si elles étaient capables d'interagir avec des protéines connues pour être leur collaborateur et si le phénotype en serait affecté. *hth*, l'homologue de *Meis1*, est un choix évident puisque *Meis1* accélère le développement des leucémies chez les souris surexprimant aussi *NUP98-HOXA9* ou *Hoxa9* (Kroon *et al.*, 2001; Thorsteinsdottir *et al.*, 2001). Ensuite, *Abd-B* a été choisi puisque son l'homologue, *Hoxa9*, est bien connu pour son rôle dans les leucémies. Le dernier gène, *abd-A* présente une homologie avec les paralogues 6 à 8 des 4 groupes *HOX* humains. Aucune étude n'a démontré le rôle de ces protéines au niveau du système hématopoïétique de la drosophile.

L'expression de *Abd-B* et *hth* seuls entraîne la formation de masses mélanotiques à approximativement la même fréquence par rapport à ce qui a été observé avec *E2A-PBX1a* (Figure 3.5) en plus de diminuer le nombre de cellules mélanisées au niveau des segments abdominaux postérieurs (Figure 3.2a, c et d). Il est encourageant de constater qu'*abd-A* ne semble pas induire de phénotype dans le système hématopoïétique, contrairement aux deux autres gènes. Ceci suggère que la formation des masses et la diminution du nombre de cellules relèvent d'un phénomène spécifique.

3.1. Effet des collaborateurs connus de HOXA9

Chez les souris, il a été démontré qu'*E2A-PBX1a* permet le développement plus rapide de la leucémie induite par *Hoxa9* (Thorsteinsdottir *et al.*, 1999). En fait, il est suggéré qu'*E2A-PBX1a* collabore avec les gènes *Hox* pour induire le phénotype leucémique

qu'on lui connaît. Les données préliminaires semblent indiquer que *NUP98-HOXA9* et *E2A-PBX1a* collaborent lorsqu'ils sont co-exprimés (Figure 3.8). On pourrait donc penser que les deux translocations induisent le développement des néoplasies en interagissant ensemble et en affectant les mêmes événements moléculaires. Autrement, on pourrait penser qu'elles affectent des événements moléculaires parallèles, mais qui convergent pour donner un phénotype de masses mélanotiques plus sévère que lorsqu'exprimées seules. Afin de vérifier ceci, on pourrait étudier le phénotype induit par la co-expression de *E2A-PBX1a* et d'un *NUP98-HOXA9* muté et désormais incapable de lier PBX1.

Il sera aussi intéressant de tester si *hth*, l'homologue de *Meis1*, peut collaborer avec *Hoxa9*, comme démontré chez les mammifères (Kroon *et al.*, 2001; Thorsteinsdottir *et al.*, 2001). Ainsi, on pourra tester la surexpression de *hth* avec *Abd-B* ou *NUP98-HOXA9*, et vérifier si cette capacité à collaborer est conservée. Les lignées portant ces transgènes recombinés sont maintenant prêtes pour répondre à cette question. La capacité des translocations humaines à collaborer avec les protéines de la drosophile supportera l'hypothèse selon laquelle l'expression des translocations leucémogéniques chez la drosophile récapitule certains des événements moléculaires conduisant à la leucémie chez la souris ou l'Homme.

4. PHÉNOTYPE DANS L'ŒIL

Le développement normal de l'œil de la drosophile requiert le bon fonctionnement de voies de signalisation, telles les voies Notch, WG (Wingless), RTK-RAS-MAPK. En fait, les événements moléculaires impliqués

dans le développement de l'œil sont très bien caractérisés, ce qui en fait un outil de choix pour l'étude de l'effet d'une protéine sur une voie de signalisation qui y est active.

L'expression de *NUP98-HOXA9* sous le contrôle de *gmr-GAL4* induit une désorganisation considérable dans le développement de l'œil. De plus, l'expression de *NUP98-HOXA9* dans la marge de l'aile n'induit aucun phénotype (résultats obtenus par Gino Laberge). Ceci suggère deux choses : 1) les phénotypes dans l'œil et dans le système hématopoïétique ne sont pas simplement causés par la surexpression d'une protéine qui dérégule de façon aléatoire l'organisation du tissu où elle est exprimée; 2) *NUP98-HOXA9* interagit avec certains mécanismes qui sont soit distincts ou communs entre le développement du système hématopoïétique et l'œil. Si, en effet, certains de ces mécanismes sont communs, le phénotype induit dans l'œil facilitera grandement la mise en place d'un crible génétique permettant l'identification de gènes collaborateurs/antagonistes de *NUP98-HOXA9*.

5. CONCLUSION

J'ai mis au point un modèle de leucémie chez la drosophile en utilisant des translocations humaines. L'expression de *E2A-PBX1a* et *NUP98-HOXA9* a permis de confirmer qu'il est possible d'établir un phénotype quantifiable et spécifique dans le système hématopoïétique de la drosophile. De plus, des essais préliminaires indiquent qu'il semble y avoir une collaboration entre les deux oncoprotéines. Ainsi, le rôle accélérateur de *E2A-PBX1a* démontré chez les mammifères pourrait être conservé chez la drosophile. Finalement, l'expression de *NUP98-HOXA9* induit une désorganisation lors du développement de l'œil indiquant

que des interacteurs ou des cibles génétiques y sont présents et essentiels à l'organisation normale de l'œil. Il reste toutefois un travail important quant à la validation du modèle, tant au niveau du phénotype induit dans le système hématopoïétique que celui dans l'œil.

Seules deux translocation ont été utilisées ici pour la mise au point d'un système génétique pour identifier des gènes pertinents à l'action d'oncogènes leucémogéniques. Il serait possible d'étendre ce modèle à d'autres translocations ou gènes activés induisant des leucémies chez les mammifères. Par la suite, les molécules ainsi identifiées pourront être étudiées chez les mammifères afin de confirmer leur rôle dans la leucémie.

RÉFÉRENCES

1. Abu-Shaar,M., Ryoo,H.D., and Mann,R.S. (1999). Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.*, **13**, 935-945.
2. Agaisse,H. and Perrimon,N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.*, **198**, 72-82.
3. Agaisse,H., Petersen,U.M., Boutros,M., Mathey-Prevot,B., and Perrimon,N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell*, **5**, 441-450.
4. Akam,M., Averof,M., Castelli-Gair,J., Dawes,R., Falciani,F., and Ferrier,D. (1994). The evolving role of Hox genes in arthropods. *Dev. Suppl*, 209-215.
5. Alfonso,T.B. and Jones,B.W. (2002). *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **248**, 369-383.
6. Altucci,L., Clarke,N., Nebbioso,A., Scognamiglio,A., and Gronemeyer,H. (2005). Acute myeloid leukemia: therapeutic impact of epigenetic drugs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1752-1762.
7. Anderson,K.V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 13-19.
8. Armstrong,S.A., Staunton,J.E., Silverman,L.B., Pieters,R., den Boer,M.L., Minden,M.D., Sallan,S.E., Lander,E.S., Golub,T.R., and Korsmeyer,S.J. (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.*, **30**, 41-47.
9. Asha,H., Nagy,I., Kovacs,G., Stetson,D., Ando,I., and Dearolf,C.R. (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics*, **163**, 203-215.

10. Ayton, P.M. and Cleary, M.L. (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev.*, **17**, 2298-2307.
12. Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E.C., te Riele, H.P., Volland, J.R., Sharp, L.L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., and Murre, C. (1997b). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 4782-4791.
13. Bernardoni, R., Vivancos, V., and Giangrande, A. (1997). glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev. Biol.*, **191**, 118-130.
14. Berthelsen, J., Kilstrup-Nielsen, C., Blasi, F., Mavilio, F., and Zappavigna, V. (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev.*, **13**, 946-953.
15. Bettencourt, R., Asha, H., Dearolf, C., and Ip, Y.T. (2004). Hemolymph-dependent and -independent responses in *Drosophila* immune tissue. *J. Cell Biochem.*, **92**, 849-863.
16. Beuchle, D., Struhl, G., and Muller, J. (2001). Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development*, **128**, 993-1004.
17. Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 9-23.
18. Bijl, J., Sauvageau, M., Thompson, A., and Sauvageau, G. (2005). High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia. *Genes Dev.*, **19**, 224-233.
19. Bingham, P.M., Kidwell, M.G., and Rubin, G.M. (1982). The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the P element, a P-strain-specific transposon family. *Cell*, **29**, 995-1004.
20. Borrow, J., Shearman, A.M., Stanton, V.P., Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A.J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y.L., Morris, C., Ohyashiki, K., Toyama, K., Rowley, J., and Housman, D.E. (1996). The t(7;11)(p15;p15)

translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat. Genet.*, **12**, 159-167.

21. Bowen,D.T., Frew,M.E., Hills,R., Gale,R.E., Wheatley,K., Groves,M.J., Langabeer,S.E., Kottaridis,P.D., Moorman,A.V., Burnett,A.K., and Linch,D.C. (2005). RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*, **106**, 2113-2119.
22. Brand,A.H. and Perrimon,N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.
23. Braun,A., Hoffmann,J.A., and Meister,M. (1998). Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 14337-14342.
24. Braun,A., Lemaitre,B., Lanot,R., Zachary,D., and Meister,M. (1997). *Drosophila* immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap. *Genetics*, **147**, 623-634.
25. Bruckner,K., Kockel,L., Duchek,P., Luque,C.M., Rorth,P., and Perrimon,N. (2004). The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev. Cell*, **7**, 73-84.
26. Bulet,P., Stocklin,R., and Menin,L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, **198**, 169-184.
27. Calvo,K.R., Knoepfler,P., McGrath,S., and Kamps,M.P. (1999). An inhibitory switch derepressed by pbx, hox, and Meis/Prep1 partners regulates DNA-binding by pbx1 and E2a-pbx1 and is dispensable for myeloid immortalization by E2a-pbx1. *Oncogene*, **18**, 8033-8043.
28. Carroll,A.J., Crist,W.M., Parmley,R.T., Roper,M., Cooper,M.D., and Finley,W.H. (1984). Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood*, **63**, 721-724.
29. Casares,F. and Mann,R.S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature*, **392**, 723-726.

30. Castelli-Gair,J., Greig,S., Micklem,G., and Akam,M. (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development*, **120**, 1983-1995.
31. Chang,C.P., Jacobs,Y., Nakamura,T., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., and Cleary,M.L. (1997). Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 5679-5687.
32. Cline,M.J. (1994). The molecular basis of leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 328-336.
33. Dearolf,C.R. (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochim. Biophys. Acta*, **1377**, M13-M23.
34. Dickson,B., Sprenger,F., Morrison,D., and Hafen,E. (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature*, **360**, 600-603.
35. Duboule,D. and Dolle,P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J.*, **8**, 1497-1505.
36. Duvic,B., Hoffmann,J.A., Meister,M., and Royet,J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during Drosophila larval hematopoiesis. *Curr. Biol.*, **12**, 1923-1927.
37. Evans,C.J., Hartenstein,V., and Banerjee,U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in Drosophila and vertebrate hematopoiesis. *Dev. Cell*, **5**, 673-690.
38. Fessler,L.I., Nelson,R.E., and Fessler,J.H. (1994). Drosophila extracellular matrix. *Methods Enzymol.*, **245**, 271-294.
39. Fischbach,N.A., Rozenfeld,S., Shen,W., Fong,S., Chrobak,D., Ginzinger,D., Kogan,S.C., Radhakrishnan,A., Le Beau,M.M., Largman,C., and Lawrence,H.J. (2005). HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*, **105**, 1456-1466.

41. Fortini,M.E., Simon,M.A., and Rubin,G.M. (1992). Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation. *Nature*, **355**, 559-561.
42. Fossett,N., Hyman,K., Gajewski,K., Orkin,S.H., and Schulz,R.A. (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during Drosophila hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 11451-11456.
43. Freeman,M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the Drosophila eye. *Cell*, **87**, 651-660.
44. Fujino,T., Suzuki,A., Ito,Y., Ohyashiki,K., Hatano,Y., Miura,I., and Nakamura,T. (2002). Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15). *Blood*, **99**, 1428-1433.
45. Gateff,E. (1978). Malignant neoplasms of genetic origin in Drosophila melanogaster. *Science*, **200**, 1448-1459.
46. Gaunt,S.J., Coletta,P.L., Pravtcheva,D., and Sharpe,P.T. (1990). Mouse Hox-3.4: homeobox sequence and embryonic expression patterns compared with other members of the Hox gene network. *Development*, **109**, 329-339.
47. Gebelein,B., McKay,D.J., and Mann,R.S. (2004). Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during Drosophila development. *Nature*, **431**, 653-659.
48. Gebuhr,T.C., Bultman,S.J., and Magnuson,T. (2000). Pc-G/trx-G and the SWI/SNF connection: developmental gene regulation through chromatin remodeling. *Genesis*, **26**, 189-197.
49. Gerttula,S., Jin,Y.S., and Anderson,K.V. (1988). Zygotic expression and activity of the Drosophila Toll gene, a gene required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation. *Genetics*, **119**, 123-133.
50. Gibson,G. (2000). Evolution: hox genes and the cellared wine principle. *Curr. Biol.*, **10**, R452-R455.

51. Gilliland,D.G., Jordan,C.T., and Felix,C.A. (2004). The molecular basis of leukemia. *Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)*, 80-97.
52. Goto,A., Kadowaki,T., and Kitagawa,Y. (2003). Drosophila hemolymph gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev. Biol.*, **264**, 582-591.
53. Graham,A., Papalopulu,N., and Krumlauf,R. (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell*, **57**, 367-378.
54. Grier,D.G., Thompson,A., Kwasniewska,A., McGonigle,G.J., Halliday,H.L., and Lappin,T.R. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J. Pathol.*, **205**, 154-171.
56. Hanratty,W.P. and Ryerse,J.S. (1981). A genetic melanotic neoplasm of Drosophila melanogaster. *Dev. Biol.*, **83**, 238-249.
57. Harrison,D.A., Binari,R., Nahreini,T.S., Gilman,M., and Perrimon,N. (1995). Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.*, **14**, 2857-2865.
58. Hedengren,M., Asling,B., Dushay,M.S., Ando,I., Ekengren,S., Wihlborg,M., and Hultmark,D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in Drosophila. *Mol. Cell*, **4**, 827-837.
59. Heuer,J.G. and Kaufman,T.C. (1992). Homeotic genes have specific functional roles in the establishment of the Drosophila embryonic peripheral nervous system. *Development*, **115**, 35-47.
60. Holz,A., Bossinger,B., Strasser,T., Janning,W., and Klapper,R. (2003). The two origins of hemocytes in Drosophila. *Development*, **130**, 4955-4962.
61. Huang,L., Ohsako,S., and Tanda,S. (2005). The lesswright mutation activates Rel-related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in Drosophila melanogaster. *Dev. Biol.*, **280**, 407-420.

62. Hultmark,D. (2003). Drosophila immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.*, **15**, 12-19.
63. Imler,J.L. and Hoffmann,J.A. (2002). Toll receptors in Drosophila: a family of molecules regulating development and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **270**, 63-79.
64. Ip,Y.T. and Levine,M. (1994). Molecular genetics of Drosophila immunity. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 672-677.
65. Irving,P., Troxler,L., and Hetru,C. (2004). Is innate enough? The innate immune response in Drosophila. *C. R. Biol.*, **327**, 557-570.
66. Israels,L.G. and Israels,E.D. (1997). *Mechanisms in Hematology*.
67. Jung,S.H., Evans,C.J., Uemura,C., and Banerjee,U. (2005). The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*, **132**, 2521-2533.
68. Kasper,L.H., Brindle,P.K., Schnabel,C.A., Pritchard,C.E., Cleary,M.L., and van Deursen,J.M. (1999). CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 764-776.
69. Khush,R.S., Leulier,F., and Lemaitre,B. (2002). Immunology. Pathogen surveillance—the flies have it. *Science*, **296**, 273-275.
70. Kramer,J.M. and Staveley,B.E. (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of Drosophila melanogaster. *Genet. Mol. Res.*, **2**, 43-47.
71. Kroon,E., Thorsteinsdottir,U., Mayotte,N., Nakamura,T., and Sauvageau,G. (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J.*, **20**, 350-361.
72. Kurucz,E., Zettervall,C.J., Sinka,R., Vilmos,P., Pivarcsi,A., Ekengren,S., Hegedus,Z., Ando,I., and Hultmark,D. (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 2622-2627.

73. Laifook, J. (1966). The repair of wounds in the integument of insects. *Phys. Ther.*, **46**, 195-226.
74. Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **230**, 243-257.
75. Lawrence, H.J., Rozenfeld, S., Cruz, C., Matsukuma, K., Kwong, A., Komuves, L., Buchberg, A.M., and Largman, C. (1999). Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia*, **13**, 1993-1999.
76. Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science*, **288**, 146-149.
77. Lebestky, T., Jung, S.H., and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev.*, **17**, 348-353.
78. Lee, G.R., Bithell, T.C., Foerster, J., Athens, J.W., and Lukens, J.N. (1993). *Wintrobe's Clinical Hematology*.
79. Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, **276**, 565-570.
80. Lin, Y.W. and Aplan, P.D. (2004). Leukemic transformation. *Cancer Biol. Ther.*, **3**, 13-20.
81. Lu, Q., Knoepfler, P.S., Scheele, J., Wright, D.D., and Kamps, M.P. (1995). Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 3786-3795.
82. Luo, H., Hanratty, W.P., and Dearolf, C.R. (1995). An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J.*, **14**, 1412-1420.
83. Magli, M.C., Barba, P., Celetti, A., De Vita, G., Cillo, C., and Boncinelli, E. (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 6348-6352.

84. Mathey-Prevot, B. and Perrimon, N. (1998). Mammalian and *Drosophila* blood: JAK of all trades? *Cell*, **92**, 697-700.
85. Meister, M., Lemaitre, B., and Hoffmann, J.A. (1997). Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays*, **19**, 1019-1026.
86. Moses, K. and Rubin, G.M. (1991). Glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing *Drosophila* eye. *Genes Dev.*, **5**, 583-593.
87. Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., and . (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-544.
88. Nakamura, T., Largaespada, D.A., Lee, M.P., Johnson, L.A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S.J., Willman, C.L., Chen, I.M., Feinberg, A.P., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Shaughnessy, J.D., Jr. (1996). Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat. Genet.*, **12**, 154-158.
89. Nappi, A.J., Frey, F., and Carton, Y. (2005). *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *J. Insect Physiol.*, **51**, 197-205.
90. Natzle, J.E., Monson, J.M., and McCarthy, B.J. (1982). Cytogenetic location and expression of collagen-like genes in *Drosophila*. *Nature*, **296**, 368-371.
91. nobelprize.org.
www.nobelprize.org/medecine/laureates/1933.morgan-bio.html. 2005.
92. Owens, B.M. and Hawley, R.G. (2002). HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, **20**, 364-379.
93. Pai, C.Y., Kuo, T.S., Jaw, T.J., Kurant, E., Chen, C.T., Bessarab, D.A., Salzberg, A., and Sun, Y.H. (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein,

- extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **12**, 435-446.
94. Paladi, M. and Tepass, U. (2004). Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in *Drosophila*. *J. Cell Sci.*, **117**, 6313-6326.
 95. Paquet, P., Pierard-Franchimont, C., Henry, F., Goffin, V., Letawe, C., and Pierard, G.E. (2005). [Laser and pulsed light treatments]. *Rev. Med. Liege*, **60 Suppl 1**, 118-124.
 96. Perkins, A.C. and Cory, S. (1993). Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J.*, **12**, 3835-3846.
 97. Perotti, M.E. and Bairati, A., Jr. (1968). Ultrastructure of the melanotic masses in two tumorous strains of *Drosophila melanogaster* (tuB3 and Freckled). *J. Invertebr. Pathol.*, **10**, 122-138.
 98. Petersen, U.M., Kadalayil, L., Rehorn, K.P., Hoshizaki, D.K., Reuter, R., and Engstrom, Y. (1999). Serpent regulates *Drosophila* immunity genes in the larval fat body through an essential GATA motif. *EMBO J.*, **18**, 4013-4022.
 99. Qiu, P., Pan, P.C., and Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development*, **125**, 1909-1920.
 100. Quong, M.W., Massari, M.E., Zwart, R., and Murre, C. (1993). A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 792-800.
 101. Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., and Manfrulli, P. (2002a). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **241**, 145-156.
 102. Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R.A. (2002b). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature*, **416**, 644-648.

103. Raza-Egilmez,S.Z., Jani-Sait,S.N., Grossi,M., Higgins,M.J., Shows,T.B., and Aplan,P.D. (1998). NUP98-HOXD13 gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.*, **58**, 4269-4273.
104. Rehorn,K.P., Thelen,H., Michelson,A.M., and Reuter,R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development*, **122**, 4023-4031.
105. Remillieux-Leschelle,N., Santamaria,P., and Randsholt,N.B. (2002). Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics*, **162**, 1259-1274.
106. Rieckhof,G.E., Casares,F., Ryoo,H.D., Abu-Shaar,M., and Mann,R.S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell*, **91**, 171-183.
107. Rizki,R.M. and Rizki,T.M. (1979). Cell interactions in the differentiation of a melanotic tumor in *Drosophila*. *Differentiation*, **12**, 167-178.
108. Rizki,T., Rizki,R., and Grell,E. (1980). *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **188**.
109. Rizki,T.M. (1978). *Genetics and Biology of Drosophila*.
110. Rizki,T.M., Rizki,R.M., and Bellotti,R.A. (1985). Genetics of a *Drosophila* phenoloxidase. *Mol. Gen. Genet.*, **201**, 7-13.
111. Robin,M., Schlageter,M.H., Chomienne,C., and Padua,R.A. (2005). Targeted immunotherapy in acute myeloblastic leukemia: from animals to humans. *Cancer Immunol. Immunother.*, **54**, 933-943.
112. Rodriguez,A., Zhou,Z., Tang,M.L., Meller,S., Chen,J., Bellen,H., and Kimbrell,D.A. (1996). Identification of immune system and response genes, and novel mutations causing melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **143**, 929-940.
113. Roth,S., Hiromi,Y., Godt,D., and Nusslein-Volhard,C. (1991). cactus, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in *Drosophila* embryos. *Development*, **112**, 371-388.

114. Ruberte,E., Marty,T., Nellen,D., Affolter,M., and Basler,K. (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo. *Cell*, **80**, 889-897.
115. Ruhf,M.L., Braun,A., Papoulas,O., Tamkun,J.W., Randsholt,N., and Meister,M. (2001). The domino gene of Drosophila encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. *Development*, **128**, 1429-1441.
116. Rutherford,M.N. and LeBrun,D.P. (1998). Restricted expression of E2A protein in primary human tissues correlates with proliferation and differentiation. *Am. J. Pathol.*, **153**, 165-173.
117. Saget,O., Forquignon,F., Santamaria,P., and Randsholt,N.B. (1998). Needs and targets for the multi sex combs gene product in Drosophila melanogaster. *Genetics*, **149**, 1823-1838.
118. Saleh,M., Huang,H., Green,N.C., and Featherstone,M.S. (2000). A conformational change in PBX1A is necessary for its nuclear localization. *Exp. Cell Res.*, **260**, 105-115.
119. Santamaria,P. and Randsholt,N.B. (1995). Characterization of a region of the X chromosome of Drosophila including multi sex combs (mxc), a Polycomb group gene which also functions as a tumour suppressor. *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 282-290.
120. Sauvageau,G., Lansdorp,P.M., Eaves,C.J., Hogge,D.E., Dragowska,W.H., Reid,D.S., Largman,C., Lawrence,H.J., and Humphries,R.K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **91**, 12223-12227.
121. Sauvageau,G., Thorsteinsdottir,U., Eaves,C.J., Lawrence,H.J., Largman,C., Lansdorp,P.M., and Humphries,R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.*, **9**, 1753-1765.

122. Schughart,K., Kappen,C., and Ruddle,F.H. (1989). Duplication of large genomic regions during the evolution of vertebrate homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **86**, 7067-7071.
123. Scott,M.P., Tamkun,J.W., and Hartzell,G.W., III (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta*, **989**, 25-48.
124. Shen,W.F., Montgomery,J.C., Rozenfeld,S., Moskow,J.J., Lawrence,H.J., Buchberg,A.M., and Largman,C. (1997a). AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6448-6458.
125. Shen,W.F., Rozenfeld,S., Kwong,A., Kom ves,L.G., Lawrence,H.J., and Largman,C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 3051-3061.
126. Shen,W.F., Rozenfeld,S., Lawrence,H.J., and Largman,C. (1997b). The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Pbx1a on a novel DNA target. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8198-8206.
127. Shrestha,R. and Gateff,E. (1986). Ultrastructure and cytochemistry of the tumorous blood cells in the mutant lethal (3) malignant neoplasm of *Drosophila melanogaster*. *J. Invertebr. Pathol.*, **48**, 1-12.
128. Sies,H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 916-921.
129. Sinenko,S.A., Kim,E.K., Wynn,R., Manfrulli,P., Ando,I., Wharton,K.A., Perrimon,N., and Mathey-Prevot,B. (2004). Yantar, a conserved arginine-rich protein is involved in *Drosophila* hemocyte development. *Dev. Biol.*, **273**, 48-62.
130. Slape,C. and Aplan,P.D. (2004). The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leuk. Lymphoma*, **45**, 1341-1350.
131. Soderhall,K. and Cerenius,L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 23-28.

132. Sorrentino, R.P., Carton, Y., and Govind, S. (2002). Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.*, **243**, 65-80.
133. Sorrentino, R.P., Gajewski, K.M., and Schulz, R.A. (2005). GATA factors in *Drosophila* heart and blood cell development. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **16**, 107-116.
134. Sorrentino, R.P., Melk, J.P., and Govind, S. (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics*, **166**, 1343-1356.
135. Stramer, B., Wood, W., Galko, M.J., Redd, M.J., Jacinto, A., Parkhurst, S.M., and Martin, P. (2005). Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J. Cell Biol.*, **168**, 567-573.
136. Taketani, T., Taki, T., Shibuya, N., Kikuchi, A., Hanada, R., and Hayashi, Y. (2002). Novel NUP98-HOXC11 fusion gene resulted from a chromosomal break within exon 1 of HOXC11 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Cancer Res.*, **62**, 4571-4574.
137. Tepass, U., Fessler, L.I., Aziz, A., and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development*, **120**, 1829-1837.
138. Therrien, M., Chang, H.C., Solomon, N.M., Karim, F.D., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*, **83**, 879-888.
139. Therrien, M., Wong, A.M., and Rubin, G.M. (1998). CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell*, **95**, 343-353.
140. Thorsteinsdottir, U., Kroon, E., Jerome, L., Blasi, F., and Sauvageau, G. (2001). Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 224-234.
141. Thorsteinsdottir, U., Kros, J., Kroon, E., Haman, A., Hoang, T., and Sauvageau, G. (1999). The oncoprotein E2A-Pbx1 collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 6355-6366.

142. Thorsteinsdottir,U., Sauvageau,G., Hough,M.R., Dragowska,W., Lansdorp,P.M., Lawrence,H.J., Largman,C., and Humphries,R.K. (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 495-505.
143. Tirouvanziam,R., Davidson,C.J., Lipsick,J.S., and Herzenberg,L.A. (2004). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 2912-2917.
144. Torok,T., Tick,G., Alvarado,M., and Kiss,I. (1993). P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics*, **135**, 71-80.
145. Waltzer,L., Ferjoux,G., Bataille,L., and Haenlin,M. (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J.*, **22**, 6516-6525.
146. Watson,F.L., Puttmann-Holgado,R., Thomas,F., Lamar,D.L., Hughes,M., Kondo,M., Rebel,V.I., and Schmucker,D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, **309**, 1874-1878.
147. Watson,K.L., Johnson,T.K., and Denell,R.E. (1991). Lethal(1) aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.*, **12**, 173-187.
148. Williams,D.L., Look,A.T., Melvin,S.L., Roberson,P.K., Dahl,G., Flake,T., and Stass,S. (1984). New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, **36**, 101-109.
149. Yan,W., Young,A.Z., Soares,V.C., Kelley,R., Benezra,R., and Zhuang,Y. (1997). High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 7317-7327.
150. Yasothornsrikul,S., Davis,W.J., Cramer,G., Kimbrell,D.A., and Dearolf,C.R. (1997). viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene*, **198**, 17-25.

151. Zettervall,C.J., Anderl,I., Williams,M.J., Palmer,R., Kurucz,E., Ando,I., and Hultmark,D. (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14192-14197.

ANNEXES

Annexe 1 : Permission d'Elsevier pour l'utilisation de la Figure 1.4

Afficher sous forme de page Web

Dear Ms Casgrain

We hereby grant you permission to reproduce the material detailed below in your thesis at no charge subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.

2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier".

3. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.

4. This permission is granted for non-exclusive world French rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.

5. This includes permission for the National Library of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely,
<<...OLE_Obj...>>

Natalie David
Rights Assistant

Request From:
Amelie Casgrain
University of Montreal
CP 6128 succ A
H3C 3J7
Montreal

Canada

Contact Details:

Telephone: 514.343.6111 ext 8091

Fax:

Email Address: [REDACTED]

To use the following material:

ISSN/ISBN:

Title: Biochimica et Biophysica Acta

Author(s): Charles R. Dearolf

Volume: 1377

Issue: 1

Year: 1998

Pages: M13 - M23

Article title: Fruit fly "leukemia"

How much of the requested material is to be used:

Figure 3. The melanotic mass phenotype

Are you the author: No

Author at institute: No

How/where will the requested material be used: In a thesis or dissertation

Details:

The figure will be used to illustrate the melanotic mass phenotype in a Master Degree thesis in French, called "Mise au point d'un modèle de leucémie chez la Drosophile".

Additional Info: - end -

For further info regarding this automatic email, please contact:

WEB APPLICATIONS TEAM (esweb.admin@elsevier.co.uk)